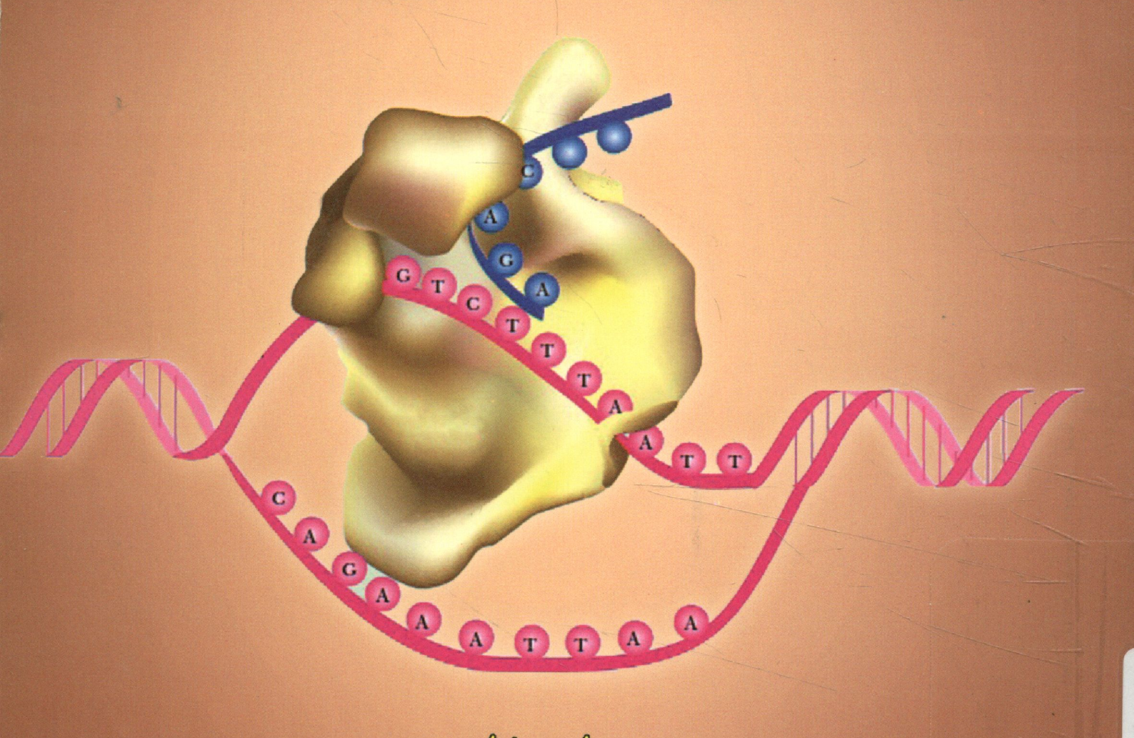
مدخل فى
الچينات والهندسة الوراثية

Introduction to Genes and Genetic Engineering



إعداد

الأستاذ الدكتور
منير السعيد محمد موسى
أستاذ الوراثة الجزيئية

الأستاذ الدكتور
محمد محمد عبد الفتاح ياقوت
أستاذ الوراثة و البيوتكنولوجى

كلية الزراعة - جامعة الاسكندرية

هذا الكتاب

يعتبر أحد الكتب الرائدة فى مجال البيولوجيا الجزيئية الصادرة باللغة العربية وهو يفيد الدارسين والباحثين فى مجالات التقنية الحيوية والزراعة والطب والصيدلة والعلوم لتكوين خلفية جيدة عن الجينات وتطبيقات الهندسة الوراثية.

من المواضيع الاساسية التى يتناولها هذا الكتاب:

- الطبيعة الكيمائية للجينات
- الشفرة الوراثية والتخليق الحيوى للبروتين
- الطبيعة الكيميائية للتعبير الجينى
- تنظيم التعبير الجينى فى الكائنات حقيقة النواة وغير حقيقية النواة

كما يشرح االعديد من التطبيقات الحديثة فى الهندسة الوراثية مع الاستعانة بالرسومات التوضيحية، ومن تلك التطبيقات:

- » النباتات والحيوانات المعدلة جينياً
- » الأستنساخ
- » العلاج الجيني
- » البيولوجيا الجزيئية للسرطان

ويمتيز هذا الكتاب فى نهايته بوجود مسرد (Glossary) للمص
الواردة به باللغتين الانجليزية والعربية مع شرحها ليسهل للقارئ
المراجع الأجنبية الحديثة وشبكة الانترنت

المؤلف


ISBN 978-977-396-137-4
9 789773 961374
رقم الايداع 2013/15821



مدخل فى
الچينات والهندسة الوراثية

Introduction to
Genes and Genetic Engineering

إعداد

الأستاذ الدكتور
منير السعيد محمد موسى
أستاذ الوراثة الجزيئية

الأستاذ الدكتور
محمد محمد عبد الفتاح ياقوت
أستاذ الوراثة و البيوتكنولوجى

كلية الزراعة – جامعة الاسكندرية

اسم الكتاب : مدخل فى الجينات والهندسة الوراثية

المؤلفين : منير السعيد محمد موسى - محمد محمد عبد الفتاح ياقوت

الطبعة الاولى: 2014

رقم الايداع : 15821 / 2013

الترقيم الدولى : 4 - 137 -393 - 977 I.S.B.N. 978

الناشر

مكتبة بستان المعرفة

ج. م .ع - كفر الدوار ـ الحدائق – ش سور المصنع أمام أبراج الحلوانى

☎ 045/2202659 & الإسكندرية 0121151237

E-mail: bostan_elma3rafa@yahoo.com

الطباعة والتجهيزات الفنية:

منشأة الشنهابى للطباعة والنشر

E-mail: shenhapy@yahoo.com

تمهيد

في الثلاثين سنة الأخيرة من القرن العشرين حدثت ثورة علمية هائلة في طرق التقنية الحيوية الحديثة التي تمثلت في التحسين الهائل لطرق التعامل مع المادة الوراثية (DNA) عملياً وتطبيق هذه الطرق في مجال الوراثة الجزيئية والذي يعرف بالهندسة الوراثية.

ولقد أصبح من المؤكد نجاح استخدام طرق التقنية الحيوية الحديثة في إنتاج أصناف نباتية معدلة چينياً وخاصة تلك المقاومة وراثياً لبعض مبيدات الحشائش الكيميائية وكذلك مقاومة وراثياً لبعض الآفات الحشرية. والأكثر من ذلك أمكن هندسة البكتيريا چينياً واستخدامها كمصانع بيولوجية لإنتاج بعض هرمونات الإنسان مثل هرمون الإنسولين والسوماتوستاتين والسوماتوتروبين وكذلك إنتاج حيوانات معدلة چينياً كما امتد هذا التطبيق لهندسة الچينات أو الهندسة الوراثية في مجال العلاج الچيني لبعض الأمراض الوراثية في الإنسان.

لذلك فإننا نقدم هذا الكتاب إلى المكتبة العربية يحدونا الأمل في أن يكون إضافة معرفية في مجال الچينات والهندسة الوراثية. ولقد وضعت أبواب هذا الكتاب في ترتيب متناسق ومتكامل حيث تضمنت أبوابه الچينات وطبيعة تركيبها وتعبيرها وتنظيم تعبيرها الچيني في كل من الكائنات غير حقيقية النواة و الكائنات حقيقية النواة كما تضمن هذا الكتاب باب مستقل عن أساسيات وطرق الهندسة الوراثية للچينات وكذلك باب مستقل عن النباتات المعدلة چينياً بالهندسة الوراثية وباب مستقل عن العلاج الچيني وباب مستقل عن البيولوجيا الجزيئية للسرطان وفي النهاية باب عن التكاثر الكلوني في الحيوانات.

ولقد راعينا في هذا الكتاب الاحتفاظ بالمصطلحات الأجنبية مع تعريبها حرفياً حتى لا يجهد القارئ نفسه ويزيد من تركيزه في فهم الموضوعات المتنوعة.

ونسأل الله تعالى أن يسدد خطانا ويجزل لنا الثواب يوم المآب راجين منه أن يصل عملنا هذا خالصاً لوجهه الكريم ونرجو ممن قرأ فيه فاستفاد أن يخصنا بدعوة صالحة تنفعنا يوم الميعاد وصلى الله على سيدنا محمد وآله وصحبه وسلم تسليماً كثيراً.

المحتويات

الباب الأول

الطبيعة الكيميائية للچينات

Chemical Nature of Genes or DNA

مقدمة تاريخية

منذ حوالى أربعة بلايين سنة كان جزيء الـــDNA المزدوج الخيط (Double-strand) هو الجزىء المحفوظ والحامل للمعلومات الوراثية. ومنذ حوالى ٣,٧ بليون سنة كانت الخلايا البكتيريةالأولية تحتوى الـــDNA فى كروموسومها ووجد ايضا منذ حوالى ٢ مليون سنة أن الخلايا النباتية والحيوانية والطحالب كانت كروموسوماتها أيضاً تحمل الـــDNA.

ومنذ ذلك الوقت لم يتغير تركيب جزىء الـــDNA بينما على العكس من ذلك أتسع التطور بين الكائنات المختلفة وأمتد الى الأختلاف فى برمجة المادة الوراثية أو المعلومات الوراثية التى تخزن فى جزيء الـــDNA. وتحت ظروف خاصة من وجود قليل من الأكسيچين أو عدمه فإن جزىء الـــDNA يقاوم المدى الواسع من درجات الحرارة والضغط والرطوبة ويظل ثابتاً نسبياً لمئات السنين حيث أوضحت الدراسات التى أجراها علماء البيولوجيا الجزيئية أن جزىء الـــDNA المعزول من آثار لحفريات قديمة يظل حاملاً للمعلومات الوراثية وذلك من دراسة الـــDNA المعزول من آثار الحمار البرى المنقرض (Quagga) عمرها مائة عام وكذلك الـــDNA المعزول من جمجمة أنسان عمرها ٨٠٠٠ عام وأيضاً الـــ DNA المعزول من الهيكل العظمى للإنسان الأولى Neanderthal والذى يبلغ عمره ٣٠٠٠ عام والذى اكتشف آثاره فى ألمانيا عام ١٩٨٥ ولقد أكدت الأبحاث التى أجريت فى التسعينات من القرن العشرين على عينات الـــDNA القديمة أو الأثرية أن جزيء الـــDNA يتمتع بدرجة عالية من الثبات الكيميائى مما يجعله جزيء التوارث.

وفى الثمانينات من القرن التاسع عشر استطاع مندل Mendel ونجاحه الباهر فى ذلك الوقت من أستخدام البيانات الناتجة من تجارب التربية أن يستدل على وجود ونشاط الچينات (Genes) من خلال تحليل تأثير الأليلات المتبادلة (Alternative alleles) على الشكل المظهرى (Phenotype) وكذلك التلازم بين الچينات وحركة الكروموسومات فى الوقت والمكان الذى اكتشفه علماء الوراثة فى العقود الأولى من القرن العشرين. وبهذه الطريقة فإنه من الممكن التنبأ بنتائج التهجينات الوراثية فى غياب المعلومات التفصيلية عن الجزيئات والتفاعلات البيوكيميائية والتى تشكل الأساس فى الأحداث المشاهده. ومع ذلك فإنه بدون فهمنا للجزيئات التى تحتوى على الچينات (Genes) يكون من المستحيل اكتشاف الآليات (Mechanisms) الحقيقية والتى عن طريقها تستطيع الچينات تحديد الشكل المظهرى وكذلك انتقال المعلومات الوراثية بين الأجيال واشتقاق المعلومات الوراثية الجديدة. ولهذه الأسباب سوف نتناول فحص وتركيب الـDNA والذى تتركب منه المادة الوراثية عند المستوى الجزيئى ومن ثم سوف نتناول بالدراسة طبيعية تركيب الـDNA وكذلك وظائفه الوراثية والتى تعتمد على بروتينات معينة تتفاعل مع الـDNA والتى من بينها على سبيل المثال تلك البروتينات التى ترتبط بالـDNA ليبدأ تضاعفه وعلى ذلك سوف نتناول النقاط التالية:

١- كيف أوضح العلماء أن الـDNA هو المادة الوراثية.

٢- النموذج البنائى لتركيب جزيء الـDNA والذى وضعه العالمين واطسون (Watson) وكريك (Crick) .

٣- كيف يقوم الـDNA بحفظ المادة الوراثية.

٤- كيف يقدم بناء جزيء الـDNA الوسيلة الدقيقة لتضاعفه.

ومن الحقائق العلمية المؤكده أن الـDNA هو المادة الوراثية وذلك من نتائج التجارب المكثفة التى أجريت على مدى ثلاثين عاماً فى الفترة ما بين ١٩٢٢ وحتى عام ١٩٥٢ والتى أقنعت المؤسسات العلمية بأن الـDNA هو جزيء التوارث (Molecule of heredity).

أولاً: الخصائص الكيميائية لموقع الـDNA بالكروموسومات

فى عام ١٨٦٩ أستخلص العالم Friedrich Miescher مادة حامضية ضعيفة وغنية بالفوسفور من أنوية (Nuclei) خلايا الدم البيضاء فى الإنسان وسميت هذه المادة باسم نيوكلين (Nuclein) وهذه المادة لا تشبه عديد من المركبات الكيميائية السابق معرفتها ومعظم مكونات هذه المادة كانت الـDNA على الرغم من أنها لم تكن نقيه تماماً والاسم الكيميائى للـDNA هو (Deoxyribonucleic acid) والذى يتركب من وحدات بنائية معينة وبعد تنقية الـDNA من أنوية الخلايا وبمعاملته بعديد من المعاملات المختلفة أوضح العلماء أن الوحدات البنائية المختلفة مرتبطة ببعضها فى صورة خيط طويل وتنتمى هذه الوحدات البنائية المختلفة الى قسم من المركبات يعرف باسم النيوكليوتيدات (Nucleotides) والتى ترتبط ببعضها عن طريق رابطة فوسفودايستر(Phosphodiester) مكونة خيط متعدد النيوكليوتيدات يعرف باسم (Polydexoyribonucleotide).

والطريقة التى ذكرت لأول مرة فى عام ١٩٢٧ لاكتشاف أين يقع الـDNA فى الخلية سميت باسم تفاعل فولجين (Feulgen reaction) حيث يؤدى هذا التفاعل الى صبغ الـDNA باللون الأحمر فى التحضيرات الخلوية المصبوغة بالفلوجين ووجد أن الكروموسومات تأخذ اللون بينما تظل باقى مكونات ومناطق الخلية عديمة اللون وبذلك أوضح وأكد هذا التفاعل أن الـDNA يقع فى الكروموسومات ومع ذلك فان اكتشاف وقوع الـDNA بالكروموسومات لم يوضح الدور الذى تقوم به الچينات أو الـDNA فى ذلك الوقت. ونظراً لأن كروموسومات الكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes) تحتوى على كميات كبيرة من البروتين وكذلك تتركب البروتينات من ٢٠ حامض أمينى مختلف بينما يحمل الـDNA أربعة أنواع مختلفة من النيوكليوتيدات، أعتقد كثير من الباحثين فى ذلك الوقت أن البروتينات تحتوى على كثير من التنوع (Diversity) والذى يجعل من المفضل استخدامها كمادة وراثية ومع ذلك أعتقد نفس هؤلاء العلماء بأهمية الـDNA كجزء هام من تركيب الكروموسومات.

ثانياً: التجارب التى أجريت لتحديد الـــDNA هو المادة الوراثية:

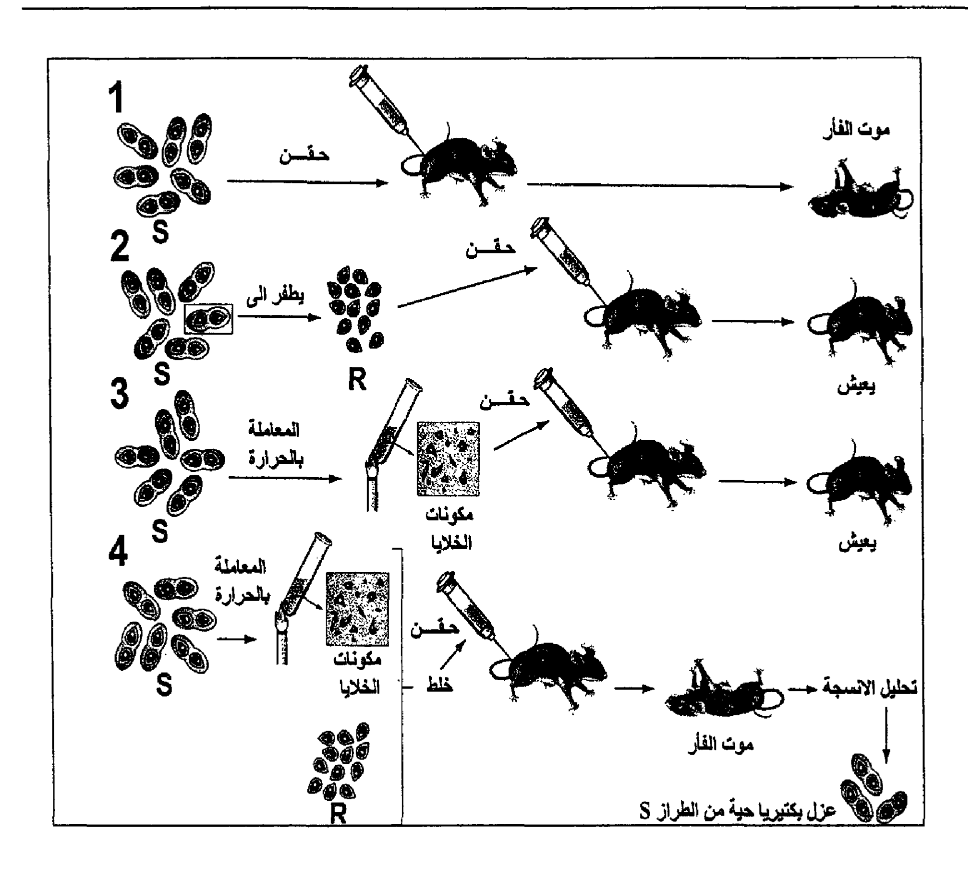
١ – التحول الوراثى البكتيرى (Bacterial Transformation)

أكدت عديد من الدراسات فكرة أن الـــDNA يجب أن يكون هو المادة الوراثية ومن أهم تلك الدراسات تلك التى أجريت على البكتيريا. فالبكتيريا تحمل مادتها الوراثية فى صورة كروموسوم مفرد دائرى والذى يقع فى سيتوبلازم الخلية البكتيريةفى صورة شديدة التفاف يعرف باسم نيوكليويد (Nucleoid) حيث لا يوجد غلاف نووى يحيط بهذا الكروموسوم ولذلك تعتبر الخلية البكتيريةأحادية التضاعف(Monoploid) وليست أحادية العدد الكروموسومى (Haploid) لأن ذلك العدد الأحادى من الكروموسومات يوجد فى الجاميطات المذكرة والمؤنثة فى الكائنات الراقية التى تتكاثر جنسياً، وعدم وجود نواة حقيقية وغلاف نووى يجعل البكتيريا من الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) وهذا ما يميزها عن الكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes) التى تحتوى خلاياها على نواة حقيقية بداخلها المادة الوراثية (الكروموسومات) وتحاط هذه النواة بغلاف نووى يفصل النواة عن سيتوبلازم الخلية كذلك تختلف البكتيريا عن الكائنات حقيقية النواة فى طريقة أنقسامها الخلوى حيث لا تنقسم بطريقة الإنقسام الميتوزى بمراحله المعروفه ولكنها تنقسم بالانشطار الثنائى (Binary fission) . مع وجود مثل هذه الاختلافات بين الكائنات حقيقية النواة وغير حقيقية النواة أعتقد بعض العلماء فى النصف الأول من القرن العشرين أن المادة الوراثية فى البكتيريا مماثلة لتلك الموجودة فى الكائنات حقيقية النواة. ومن بين المتطلبات الأساسية الوراثية فى البكتيريا كأى نوع آخر من الكائنات الراقية هو إمكانية تحديد الصور البديلة (Alternative forms) للصفة تحت الدراسة داخل العشيرة. ففى عام ١٩٢٣ استطاع العالم (Fredrick Griffith) من دراسة النوع البكتيرى *Streptococcus pneumoniae* وتنميته على بيئة غذائية من تحديد طرازين مظهريين من هذه البكتيريا (شكل١) هما :

١ – الطراز البكتيرى الناعم Smooth (S) وهو الطراز البرى من هذه البكتيريا ويرجع هذا المظهر الناعم (S) الى أن هذه البكتيريا تقوم بتخليق كبسولة (Capsule) من عديدات السكر تحيط بكل زوج من هذه الخلايا.

٢- الطراز الخشن (R) Rough وينشأ نتيجة لحدوث طفرة تلقائية فى الطراز الناعم (S) يترتب عليها عدم مقدرة هذه البكتيريا على تكوين الكبسولة Capsule من عديدا السكر ولذلك تكون مستعمرات بكتيرية ذات مظهر خشن (R) . ولقد أصبح معروفاً فى وقتنا الحالى أن الطراز الخشن (R) من البكتيريا يرجع الى أن هذه البكتيريا ينقصها إنزيم ما ضرورى لتخليق الكبسولة عديدة السكر والتى تساعد فى حماية البكتيريا ذات الطراز الناعم (S) من المضادات الحيوية البكتيريةوتصبح قادرة على إحداث العدوى وتسبب موت معظم الحيوانات المعملية التى يهاجمها هذا الطراز من البكتيريا الناعمة وعلى العكس من ذلك فان الطراز الخشن من هذه البكتيريا غير قادر على إحداث العدوى ويسبب الطراز الناعم من هذه البكتيريا الآلتهاب الرئوى للإنسان.

فى عام ١٩٢٨ نشر العالم F. Griffith اكتشاف علمى مثير وهو أن المعلومات الوراثية فى الخلايا البكتيريةالميتة من الطراز الناعم (S) يمكنها بطريقة ما الانتقال الى خلايا بكتيرية حيه من الطراز الخشن (R) ، فعند حقن الفأر ببكتيريا من الطراز الناعم (S) يسبب موت الفأر بينما حقن الفأر ببكتيريا من الطراز الخشن (R) لا يسبب موت الفأر. وكذلك عند حقن الفأر ببكتيريا من الطراز الناعم (S) والمقتولة بالحرارة لم تسبب موت الفأر بينما عند حقن الفأر بمخلوط من البكتيريا من الطراز الناعم (S) المقتولة بالحرارة وبكتيريا حية من الطراز الخشن (R) سبب ذلك موت الفأر (شكل١) . كما وجد أن البكتيريا المعزولة من دم الفئران التى ظهرت عليها أعراض المرض وقبل أن تموت كانت من الطراز الناعم (S) حيث أنه حدث انتقال لشيء ما من البكتيريا المقتولة بالحرارة من الطراز الناعم (S) والذى قام بتحويل البكتيريا الحية من الطراز الخشن (R) الى الطراز الناعم (S) وكان هذا التحول بصفة دائمة وثابتة وأن مثل هذا التحول غالباً ما يكون تحول وراثى (Genetic transformation) وذلك لأن كل الأجيال التالية من البكتيريا النامية على البيئة الغذائية كانت من الطراز الناعم (S) . وفى عام ١٩٢٩ قام معملين بحثيين أخرين بإجراء تجارب مماثلة للتجارب السابقة وحصلا على نفس النتائج السابقة.



شكل (١) : تجارب Grilfith على التحول البكتيري

شرح شكل (١)

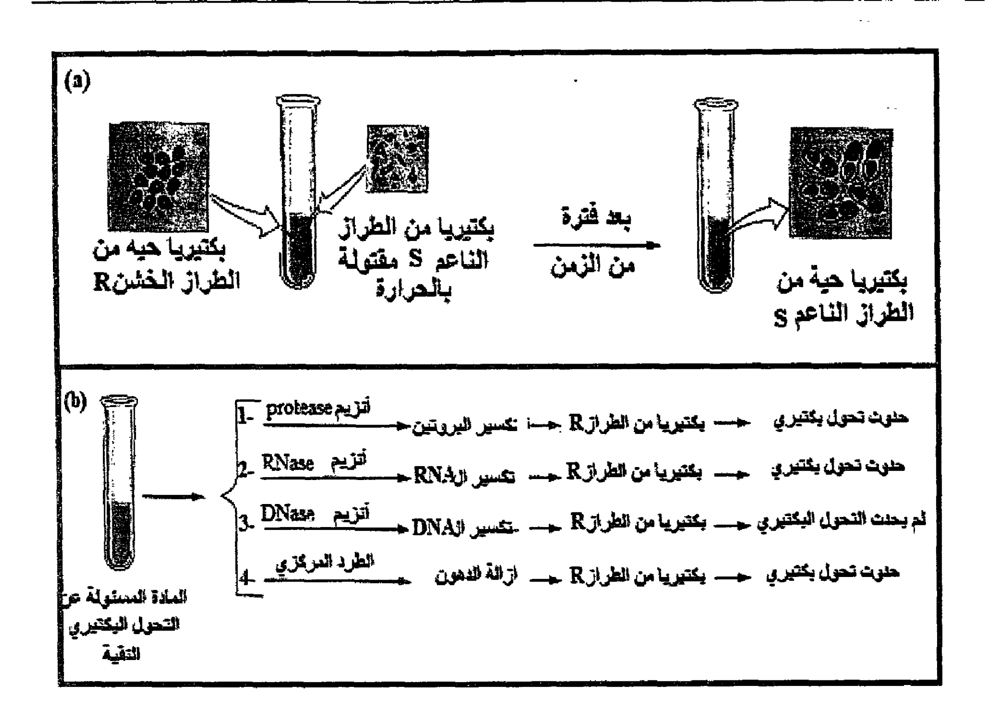
١ – البكتيريا من الطراز الناعم S والمعدية التى تسبب العدوى المميتة عند حقنها فى الفأر .

٢ – حقن البكتيريا من الطراز الخشن R والطافرة من الطراز الناعم S وهى بكتيريا غير معدية وبالتالى لا تسبب عدوى مميتة للفأر (Mice).

٣ – حقن بكتيريا من الطراز الناعم S والمقتولة بالحرارة بالفئران وأنها لاتسبب العدوى المميتة للفأر (Mice).

٤ – حدوث العدوى المميتة للفأر عند حقنه بمخلوط من البكتيريا الناعمة S والمقتولة بالحرارة والبكتيريا من الطراز الخشن R وعزل بكتيريا من الطراز الناعم S من دم الفأر الذي شارف على الموت.

وفى عام ١٩٣١ وجد الباحثين فى معمل العالم Oswald Avery أنه يمكن الوصول الى التحول البكتيرى بدون استخدام أى حيوان معملى وذلك بتنمية البكتيريا من الطراز الخشن (R) فى وجود مكونات البكتيريا من الطراز الناعم الميتة (شكل ٢). وقام العـــالم Avery بمحاولـــة تحديد المادة الوراثية فى مستخلصات البكتيريا التى سببت حدوث تحول البكتيريا مـــن الطـــراز الخشن (R) غير الضارة لتصبح خلايا من الطراز الناعم (S) الممرضة ولقد أطلق Avery اســـم أساس التحول (Transforming principle) على تلك المادة التى أحدثت هذا التحول البكتيـــرى. ولقد قضى العالم Avery عديد من السنين فى محاولة تنقية المادة المسئوله عن التحول البكتيرى بصورة كافية لتحديدها بكل دقة وبمجرد تنقيتها أمكن تحديد خصائصها ومواصفاتها وفـــى عـــام ١٩٤١ نشر العلماء Avery و Macleod و McCarty اكتشافاتهم المتجمعه من التجارب التـــى أجروها لتحديد التركيب الكيميائى للمادة المسئولة عن التحول البكتيرى (شكل ٢) ووجد أن هذه المادة كانت فعالة فى إحداث التحول البكتيرى بتركيزات منخفضة جداً وصلت الى تركيز جـــزء واحد لكل ٦٠٠ مليون جزء ولقد تأكدوا من أن المادة المسئولة عـــن التحـــول البكتيـــرى هـــى الـــDNA النقى ومع ذلك عرض الباحثون هذه المادة (DNA) الى عديد من الإنزيمات لمشاهدة ما إذا كان هناك جزيء آخر غير الـــDNA يمكنه أن يسبب التحـــول البكتيـــرى ووجـــدوا أن الإنزيمات التى تحطم أو تكسر كل من الـــRNA والبروتينات أو عديدات السكر ليس لها تـــأثير على المادة المسئولة عن التحول البكتيرى ولكن الإنزيم الذى يسبب تحطيم وتكسير الـــــDNA تسبب فى فقد المادة السئولة عن التحول لنشاطها ، وبناءاً على ذلك استنتج العلماء بكل تأكيد أن المادة المسئولة عن التحول البكتيرى هى الـــDNA ولقد ذهب العالم Avery الى أبعد من ذلـــك الـــى أن المـــادة المـــسئولة عـــن التحـــول البكتيـــرى ربمـــا تكـــون هـــى الچـــين (Gene).



شكل (٢) : أساس التحول (Transforming Principle) هو الــDNA والتجارب التأكيدية

(a)- حدوث التحول البكتيري فى البيئة الغذائية التى تحتوى على مكونات البكتيريا الناعمة S المقتولة بالحرارة وبكتيريا من الطراز الخشن R الحية وتكوين بكتيريا حية من الطراز الناعم S.

(b)- تنقية المادة المسئولة عن التحول البكتيري فى صورة نقية ومعاملتها بالإنزيمات التالية:

١ – إنزيم الــProtease الذي يحطم البروتين ومعاملته بالبكتيريا من الطراز الخشن R وحدوث تحولها إلى الطراز الناعم S.

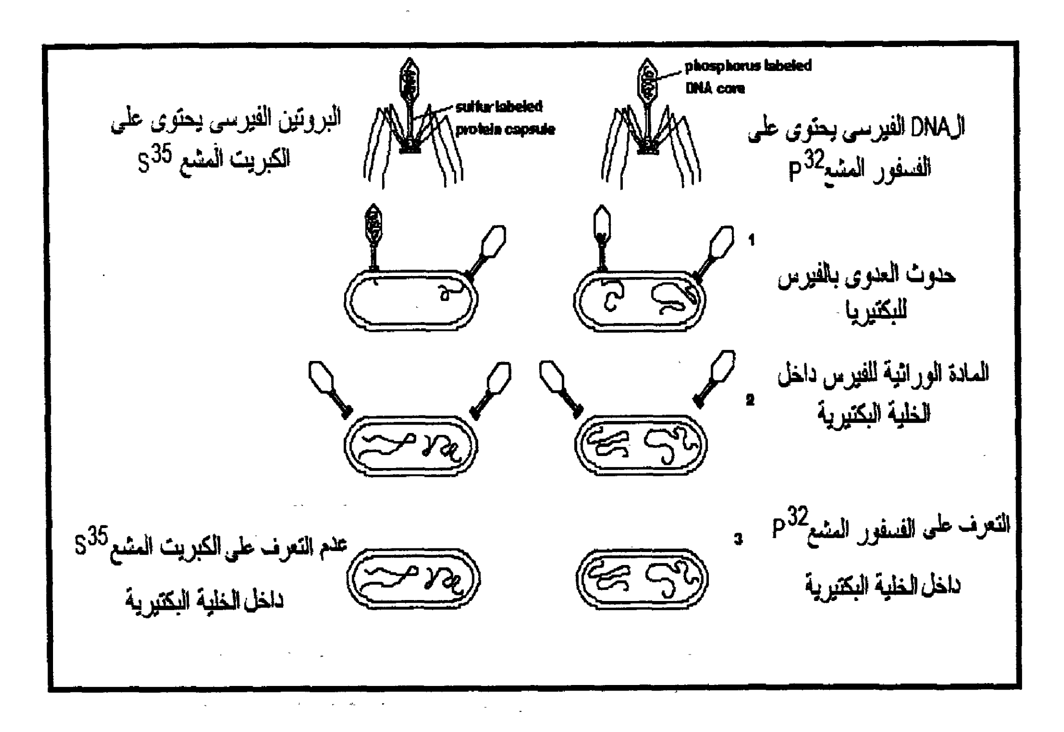
٢ – إنزيم الــRNase الذي يحطم الــRNA ومعاملته بالبكتيريا من الطراز الخشن R وحدوث تحولها إلى الطراز الناعم S.

٣ – إنزيم الــDNase الذي يحطم الــDNA ومعاملته بالبكتيريا من الطراز الخشن R وعدم حدوث تحولها إلى الطراز الناعم S.

٤ – عزل الدهون من مخلوط البكتيريا من الطراز الناعم S وحقن باقي المخلوط بالبكتيريا من الطراز الخشن R وحدوث تحولها إلى الطراز الناعم S.

٢-دراسة المادة الوراثية المسئولة عن تكاثر البكتريوفاچ

كان كل من العالم Alfred Hershiy والعالم Martha Chase سباقين فى تحديد الأهمية النسبية لكل من الـــDNA والبروتين فى تكاثر وتضاعف الڤيروسات التى تتطفل على الخلايا البكتيريةوالمعروفة باسم البكتريوفاچ (Bacteriophage) ويعتبر الڤيرس (Virus) أبسط الكائنات من حيث التركيب والوظيفة حيث أنه يقع بطريقة ما بين الخلايا الحية القادرة على التكاثر الذاتى والجزيئات الكبيرة مثل البروتينات. وتعتمد الڤيروسات على خلايا عائلة تقدم لها كل الآليات التى تحتاج إليها من أجل تكاثرها وتضاعفها كما أنها جزيئات صغيرة جداً وتحتوى على عدد قليل من الچينات. وبالنسبة لعديد من طرز الڤيروسات فإن كل جزىء ڤيرسى منها يتركب من نسب متساوية من الـــDNA والبروتين. هذه الجزيئات الـــڤيرسيه تتكاثر فقط داخل الخلايا البكتيرية العائلة وبعد حوالى ٣٠ دقيقة من العدوى تتمزق الخلية البكتيرية العائلة ويتحرر من كل خلية بكتيرية حوالى مئات من جزيئات الڤيرس الجديدة والسؤال الذى يفرض نفسه هو: ما هى المادة التى توجه وتدير إنتاج جزيئات جديدة فهل هى الـــDNA أم البروتين ؟وللإجابة على ذلك قام كل من Hershey وChase بتجارب رائده أجريت على البكتريوڤاچ T_2 حيث قاما بتنمية مجموعتين منفصلتين من هذا البكتريوڤاچ (T_2) على بكتيريا *E. coli* نامية على بيئتين غذائيتين مختلفتين حيث تحتوى البيئة الأولى على الفوسفور المشع (^{32}P) بينما تحتوى البيئة الثانية على الكبريت المشع (^{35}S) . ونظراً لأن البروتينات تحتوى على الكبريت ولا تحتوى على الفوسفور بينما يحتوى الـــDNA على الفوسفور ولا يحتوى على الكبريت وعلى ذلك تكون الڤيروسات النامية على بيئة تحتوى على الكبريت المشع (^{35}S) سوف تحتوى على بروتين مشع بينما جزيئات الڤيرس النامية على بيئة تحتوى على الفوسفور المشع (^{32}P) سوف تحتوى على DNA مشع، وبهذه الطريقة يستطيع الباحثين تحديد موقع أى مكون من مكونات الڤيرس بالنسبة للخلية البكتيريةالعائلة التى يهاجمها هذا الڤيرس ويتكاثر بداخلها. ولقد وجدا أنه بعد حدوث العدوى بالڤيرس للخلية البكتيريةالعائلة يظل البروتين المشع خارج الخلية البكتيريةالعائلة بينما يدخل الـــDNA المشع داخل الخلية البكتيريةوالذى يوجه ويدير نشاط الخلية البكيرية لتكوين جزيئات ڤيرسية جديدة واستنتجا أن چينات الڤيرس تتركب من الـــDNA (شكل٣).



شكل (٣) : تجارب البكتريوفاج T_2 التى قدمت دليلاً على أن الچينات تتركب من الـــDNA

تركيب البكتريوفاج T_2 والذي يتركب من غلاف من البروتين يحيط بالـــDNAوكذلك جزيئات البكتريوفاج T_2 والتى تحتوى على الـــDNA المعلم بالفسفور المشع P^{32} أوالتى تحتوى على البروتين، المعلم بالكبريت المشع S^{35} وحدوث العدوى بأى منهما بالبكتيريا العائلة ومشاهدة الإشعاع داخل الخلية البكتيريةالعائلة فى الحالة الأولى وانتقاله إلى النسل الڤيرس وعدم مشاهدة الإشعاع فى الحالة الثانية داخل الخلية العائلة وهذا يؤكد أن الـــDNA هو المادة الوراثية فى هذا البكتريوفاج T_2.

ثالثاً: النموذج البنائى لجزيئى الــDNA

أ- **التركيب الكيميائى للــDNA** **Chemical Composition Of DNA**

يتركب الــDNA كيميائياً من عدد طويل من الوحــدات البنائيــة تعــرف باســم النيوكليوتيــده (Nucleotide) والتى ترتبط ببعضها برابطة فوسفودايستر (Phosphodiester) مكونة خيط طويل من الــDNA وتتركب كل نيوكليوتيده من ثلاثة مكونات هى :

١- سكر الديزوكسى ريبوز Deoxyribose

٢- مجموعة فوسفات Phosphate group

٣- قاعدة نيتروچينية Nitrogen base

ويوجد أربعة قواعد نيتروچينية مختلفة هى:

أ- الأدينين (A) Adenine ب- الجوانين (G) Guanine

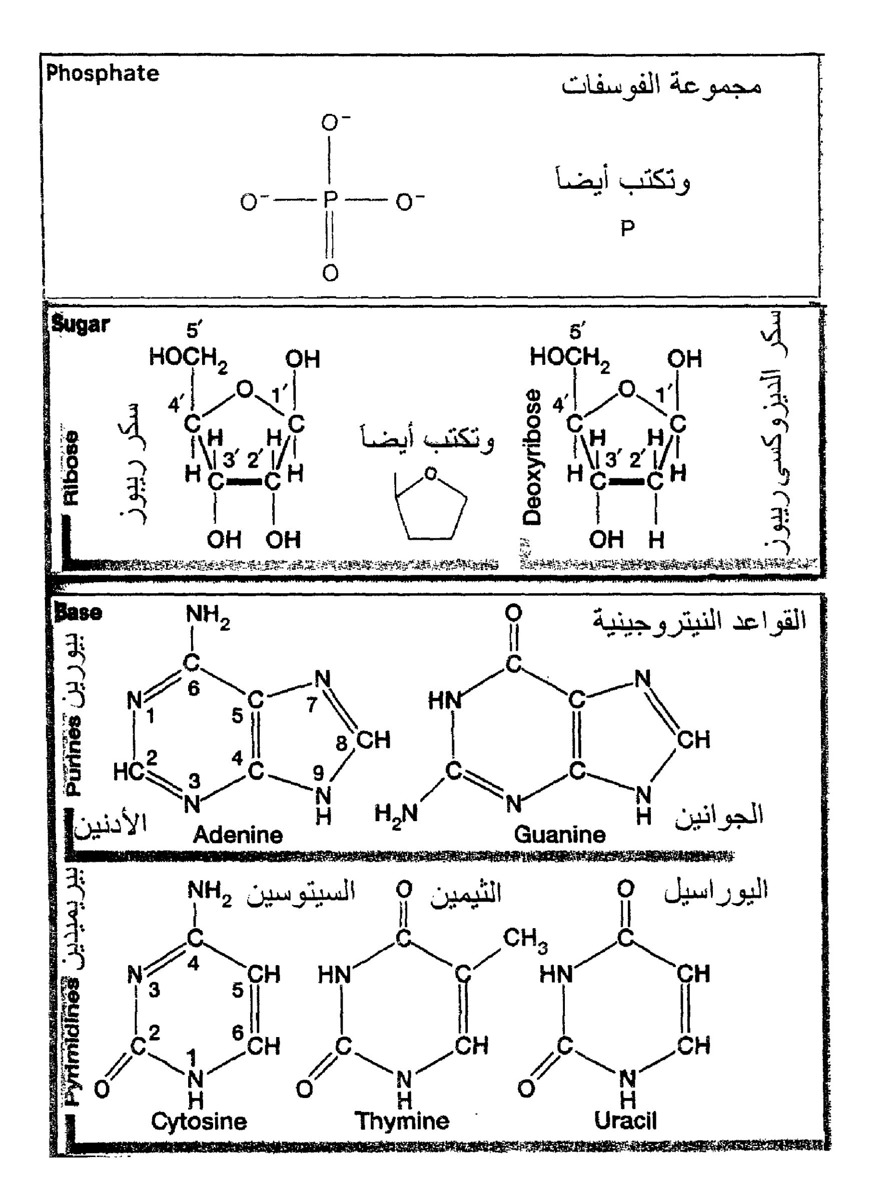
وينتميان الى البيورين Purines

ج- الثيمين (T) Thymine د- السيتوسين (C) Cytosine

وينتميان الى البيريميدين Pyrimidines

ويوضح شكل (٤) التركيب الكيميائى لهذه المكونات وكيفية ارتباطهــا مــع بعــضها لتكــوين النيوكليوتيدات (شكل ٥) وكذلك كيفية تكوين الرابطة الفوسفوداستر (Phosphodiester) والتــى تحدث دائماً بين الكربون رقم $3'$ فى النيوكيوتيده الأولى والكربون رقم $5'$ فى النيوكليوتيده الثانية بين مجموعة الهيدروكسيل فى الكربون رقم $3'$ ($3'$ - OH) فى النيكليوتيده الأولــى ومجموعــة الفوسفات ($5'$ - P) فى النيوكليوتيده الثانية وهكذا تتكون الروابط الفوسفوداستر على طول خــيط الــDNA. وخيط الــDNA المكون من عديد من النيوكليوتيدات المختلفة له قطبيــه (Polarity) ذات إتجاه محدد حيث أن الرابطة الفوسفودايستر التى تربط النيوكليوتيدات المتجاوره مع بعضها على طول خيط الــDNA تحدث دائماً بين كربون رقم $3'$ فى أحد النيكليوتيدات وكربون رقم $5'$ فى النيوكليوتيده الأخرى (شكل ٦). وهذا الإتجاه المتناسق من البناء النيوكليوتيدى يجعل لخــيط

الــDNA طرفين محددين أحدهما الطرف $5'$ حيث يكون السكر الموجود بالنيوكليوتيده الطرفية به ذرة كربون حره وهى ذرة الكربون رقم $5'$ بمعنى أنها لا ترتبط بأى نيوكليوتيده أخرى طبقاً لكيفية الطريقة التى يتضاعف بها الــDNA أو الطريقة التى يتم بها عزله وبذلك فإن الكربون رقم $5'$ إما أن تحمل مجموعة هيدروكسيل أو مجموعة فوسفات. وفى الطرف الآخر من خيط الــDNA وهو الطرف $3'$ يوجد الكربون رقم $3'$ فى نفس النيوكليوتيده الطرفيه كربون حر. وعلى طول خيط الــDNA بين الطرفين $5'$ و $3'$ تكون القطبيه محفوظة من نيوكليوتيده لأخرى بمعنى أنه يمكن وصف خيط الــ DNA فى صورة تتابع من النيوكليوتيدات الموجوده والتى تكتب من الطرف $5'$ الى الطرف $3'$.



شكل (٤) : مكونات الوحدات البنائية للأحماض النووية (DNA & RNA) .

شكل(٥) : تجميع مكونات الوحدات البنائية للــDNA

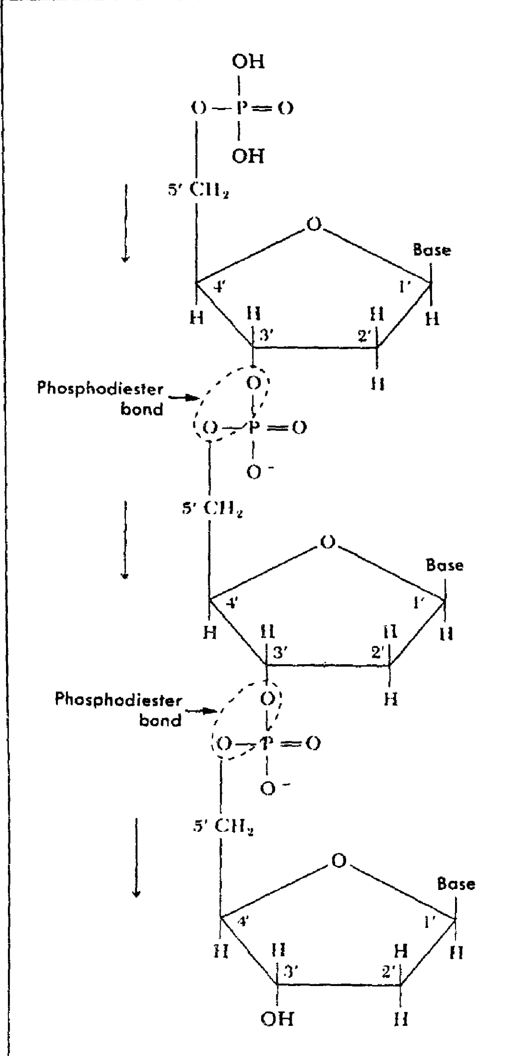
١- اتصال أو ارتباط القاعدة بالسكر لتكوين نيكليوسيد nucleoside حيث ترتبط القاعدة بكربون رقم١ فى السكر.

٢- إضافة مجموعة الفوسفات للكربون رقم ٥ لتكوين النيوكليوتيدة (Nucleotide) .

ب- الــDNA يحمل المعلومات الوراثية

نظراً لأن خيط الــDNA يتركب من عديد من النيوكليوتيدات الأربعة وهى الأدينين (A) والجوانين (G) والثيمين (T) والسيتوسين (C) والتى يختلف عددها وتتابعها باختلاف الرساله المحفوظه وبدون هذه الاختلافات من التتابع النيوكليوتيدى لا تكون هناك قدرة لهذا الــDNA على حمل المعلومات الوراثية. ونظراً لأن العمود الفقرى لخيط الــDNA عبارة عن أرتباط سكر الديزوكسى ريبوز مع مجموعة الفوسفات والذى يكون متطابق فى كل النيوكليوتيدات يصبح الاختلاف بين النيوكليوتيدات فى نوع القاعدة النيتروچينية فقط. وعلى ذلك إذا كان خيط الــDNA يحمل المعلومات الوراثية فإن هذه المعلومات يجب أن تتمثل فى الاختلافات فى تتابع القواعد الأربعة (T, C, G, A) ومن ثم فإن المعلومات التى تتكون من هذه القواعد الأربعة سوف تماثل تلك الكلمات العديدة واللانهائية الناتجة من استخدام الحروف الابجدية (٢٦ حرف) وذلك من خلال التوافيق الممكنة بين هذه الحروف بالطرق المختلفة وذلك لتوليد الكلمات اللازمة لعمل

كتاب ضخم يضم آلاف الصفحات المكتوبة وبالتالى فإن استخدام التوافيق الممكنة المختلفة بين هذه القواعد الأربعة (T, C, G, A) فى تتابع طويل من النيوكليوتيدات يمكنها أن تحمل المعلومات اللازمة لبناء الكائن الحى.



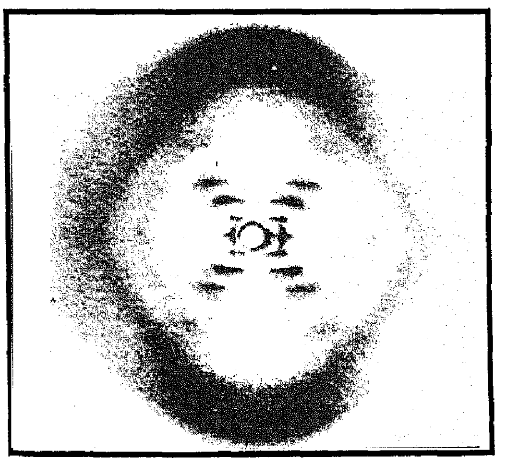
شكل (٦) : ارتبـــاط النيوكليوتيــدات ببعـــضها عـــن طريـــق الرابطـــة الفسفودايـــستر (Phosphodiester) والتى تحـــدث دائمـــاً بـــين مجموعـــة الهيدروكسيل فى كربون رقـــم $3'$ فـــى النيوكليوتيده الأولى ومجموعة الفوسفات فى كربون رقـــم $5'$ فـــى النيوكليوتيـــده الثانية وبذلك يتكون خيط من الـــDNA متعدد النيوكليوتيدات polymer chain له طرفين، أحدهما الطرف $3'$ وينتهـــى دائماً بمجموعة الهيدروكسيل فى الكربون رقم $3'$ ($3'$-OH) والطرف الآخر هو $5'$ وينتهـــي بوجـــود مجموعـــة فوســـفات بالكربون رقـــم $5'$ فـــى النيوكليوتيـــده الطرفية ($5'$-P)

جـ- نموذج الحلزون المزدوج لبناء جزيء الـDNA DNA Double Helix Model

نظراً لأنه يمكن للمعلومات أن تشفر فقط فى تتابع معين من القواعد النيتروچينية والتى يختلف عددها وترتيبها وتتابعها باختلاف الرسالة المحفوظة فى الـDNA بالكائن والتى تختلف من كائن لآخر اكتشف كريك (Crick) وواطسون (Watson) النموذج البنائى لجزيء الـDNA والذى يتمشى مع نظرية داروين للتطور (Darwin's theory of evolution) للانتخاب الطبيعى وقوانين مندل للتوارث وتفسيرهما لفهمنا للظواهر البيولوجية (Biological phenomena). ففى أبريل عام ١٩٥٣ نشر كريك (Crick) وواطسون (Watson) النموذج البنائى لتركيب جزيء الـDNA والمعروف باسمهما Waston – Crick DNA model فى مجلة Nature العلمية واعتمدوا فى بنائهم لجزيء الـDNA على نتائج الأبحاث التى أجريت فى إتجاهين مختلفين هما:

١. دراسة جزيئات الـDNA بواسطة الأشعة السينية X-rays

قام بهذه الدراسة العالمين Franklin , Wilkines وأوضحت نتائج أبحاثهم على جزيئات الـDNA بواسطة الأشعة السينية (شكل ٧) أن هذا الجزيء (DNA) حلزونى الشكل (Helix) مكون من دورات متكررة من الحلزون وأن المسافة بين هذه الوحدات المتكررة تساوى ٣,٤ انجستروم (3.4 A°) وتشكل كل دوره من دورات الحلزون مسافة مقدارها ٣٤ انجستروم (34 A°) وأن قطر هذا الجريء يساوى ٢٠ انجستروم(20A°).



شكل (٧) : نظام التمييز X-rays diffraction الناتج من معاملة جزيئات الـDNA بالأشعة السينية x-rays والتى عكست البناء الحلزونى (Helical structure) للـDNA .

٢. التحليل الكيميائى لجزيئات الـــDNA من مصادر مختلفة

قام العالم Erwin Chargaff بتحليل التركيب النيوكليوتيدى لجزيئات الـــDNA من مصادر مختلفة وبافتراض أن جزيئى الـــDNA يتركب من خيطين عديدة النيوكليوتيدات فما هى القوى التى يجب أن تربط الخيطين معاً؟ لذلك فان معرفة التركيب النيوكليوتيدى لجزيئات الـــDNA من مصادر مختلفة تقدم مفتاحاً لذلك فى غاية الأهمية. ولقد أوضحت النتائج التى حصل عليها شارجاف (Chargaff) الحقائق التالية (جدول ١) :

١ – أن كمية الثيمين (T) تساوى كمية الأدينين (A)

٢ – أن كمية الجوانين (G) تساوى كمية السيتوسين (C)

٣ – كمية الـــ DNA تختلف باختلاف الكائنات وتزداد بزيادة تعقيد الكائن.

٤ – الـــ نسبة بين $\frac{A + G}{T + C}$ تساوى واحد تقريباً.

وذلك فى جميع الكائنات التى درست وأيضاً فى كل الكائنات الأخري سواء الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) أو الكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes).

ولقد استخدم العالمين واطسون (Watson) وكريك (Crick) النتائج المتحصل عليها من التفريق بالأشعة السينية (X-rays diffraction) وكذلك المتحصل عليها من التحليل الكيميائى لجزيئات الـــDNA من مصادر مختلفة ووضعا النموذج البنائى للـــDNA وهو نموذج الحلزونى المزدوج (Double helix model) والذى يتميز بالخصائص التالية (شكل ٨) .

جدول (١) : يوضح النتائج التى حصل عليها Chargaff لتركيب القواعد بالنيوكليوتيدات لجزيئات من الـــDNA من كائنات مختلفة

Species	% Adenine (A)	% Guanine (G)	% Cytosine (C)	% Thymine (T)	$\frac{A+G}{T+C}$
I. Viruses					
Bacteriophage λ	26.0	23.8	24.3	25.8	0.99
Bacteriophage T2	32.6	18.1	16.6	32.6	1.03
Herpes simplex	13.8	37.7	35.6	12.8	1.06
II. Bacteria					
Escherichia coli	26.0	24.9	25.2	23.9	1.04
Micrococcus lysodeikticus	14.4	37.3	34.6	13.7	1.07
Ramibacterium ramosum	35.1	14.9	15.2	34.8	1.00
III. Fungi					
Neurospora crassa	23.0	27.1	26.6	23.3	1.00
Aspergillus niger	25.0	25.1	25.0	24.9	1.00
Saccharomyces cerevisiae	31.7	18.3	17.4	32.6	1.00
IV. Higher Eukaryotes					
Zea mays (corn)	25.6	24.5	24.6	25.3	1.00
Drosophila melanogaster	30.7	19.6	20.2	29.4	1.01
Homo sapiens (human)	30.2	19.9	19.6	30.3	1.01

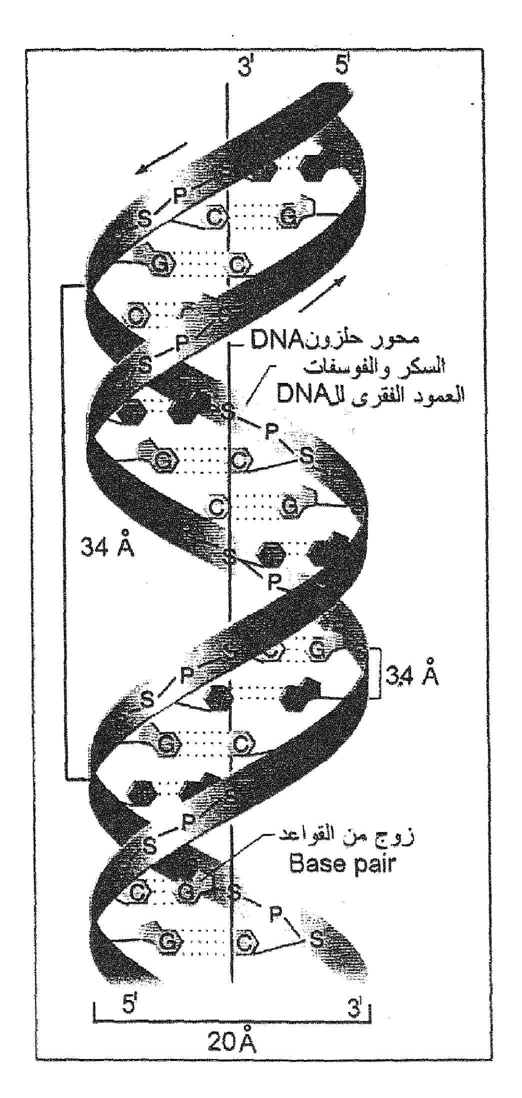
١- يتركب الـــDNA من حلزون مزدوج الخيط (Double-helix) حيث يتركب كل خيط من عديد من النيوكليوتيدات والتى ترتبط ببعضها عن طريق الرابطه فوسفودايستر (Phosphodiester).

٢- يمثل كل من السكر والفوسفات العمود الفقرى لخيط الـــDNA.

٣- يلتف الخيطان حول بعضهما حلزونيا فى دورات متكرره من الحلزون وطول كل دوره منها تساوى ٣٤ انجستروم (34 A°) وتضم كل دوره من الحلزون ١٠ أزواج من النيوكليوتيدات حيث يشغل كل زوج من النيوكليوتيدات مسافة مقدارها ٣,٤ انجستروم (3.4 A°) وأن قطر هذا الحلزون المزدوج يساوى ٢٠ أنجستروم (20 A°).

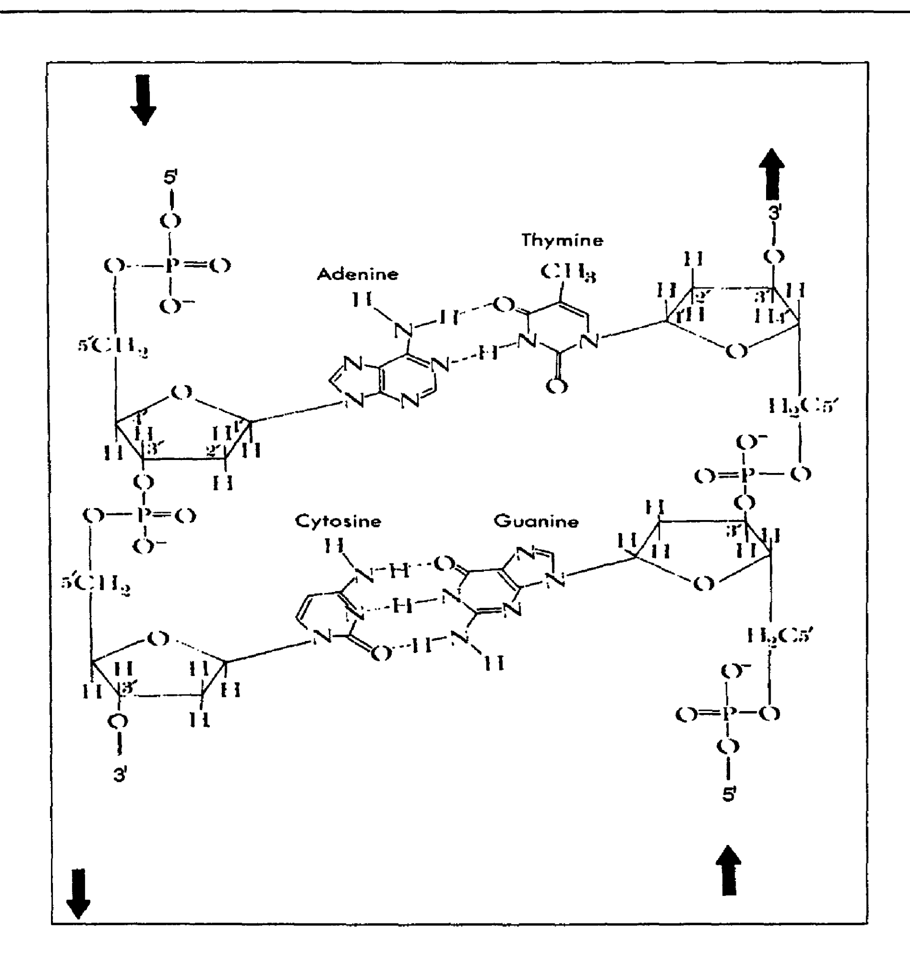
٤- يقترن دائماً الأدينين (A) فى أحد الخيطين بالثيمين (T) فى الخيط الآخر برابطتين هيدروچينتين بينما يقترن الجوانين (G) بالسيتوسين (C) بثلاثة روابط هيدروچينية.

٥- قطبية خيطى الـــDNA فى الحلزون المزدوج تكون فى إتجاه معاكس حيث تكون القطبيه فى أحد الخيطين فى الإتجاه $5' \longrightarrow 3'$ بينما تكون فى الخيط الآخر فى الإتجاه $3' \longrightarrow 5'$ (شكل٩)



شكل (٨) : نموذج الحلزون المزدوج للـDNA (Double helix)

حيث يلتف خطي الـDNA حول بعضهما حلزونياً فى دورات متكررة كل دورة طولها ٣٤ انجستروم تضم عشرة أزواج من النيوكليوتيدات وبالتالى يشغل كل زوج منها مسافة ٣,٤ انجستروم وأن قطر هذا الحلزون يساوى ٢٠ انجستروم (20 A°).



شكل (٩) : يوضح طبيعة الروابط الهيدروچينية التى تربط خطي الــDNA ببعضها وتكوين خيط الــDNA المزدوج الخيط، حيث يرتبط دائماً الأدينين (A) والثيمين (T) برابطتين هيدروچينتين ويرتبط الجوانين (G) مع السيتوسين (C) بثلاثة روابط هيدروچينية. كذلك يكون الخيطين من حيث القطبية فى إتجاهين متضادين حيث يكون أحدهما فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ والأخر فى الإتجاه $3' \rightarrow 5'$.

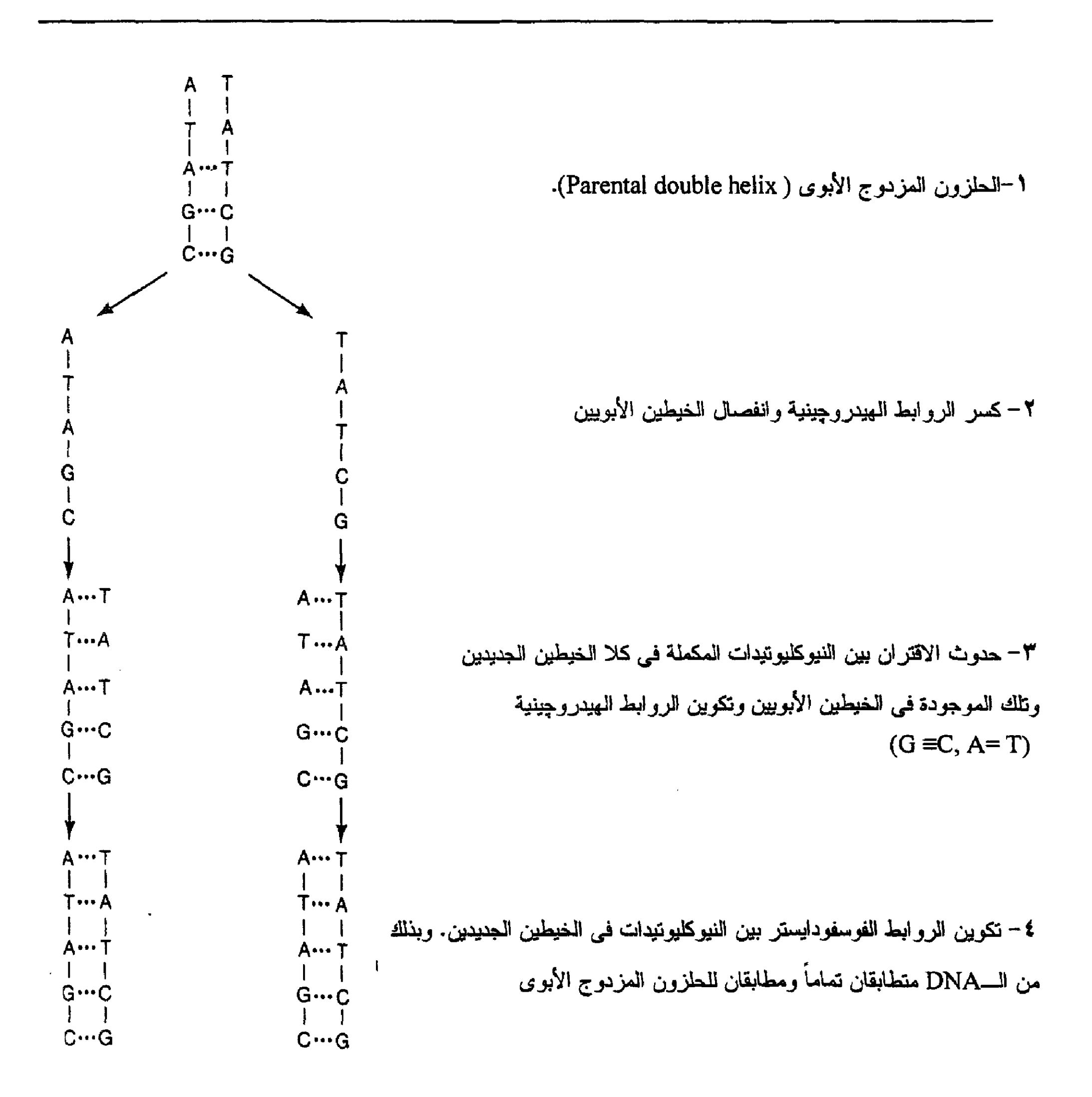
رابعاً: تضاعف الـــDNA DNA Replication

بعد أن وضع العالمين واطسون (Watson) وكريك (Crick) النموذج البنائي للـــDNA وهو نموذج الحلزون المزدوج (Double helix model) أقترحا أيضاً فى نفس الوقت الطريقة أو الآلية التى يتضاعف بها الـــDNA وتتضمن هذه الآلية ما يلى (شكل ١٠)

١- انفصال الخيطين الأبويين (Parental double helix) والذى يحتاج الى كسر الروابط الهيدروچينية بين القواعد النيتروچينية المقترنة ببعضها. وهذه الروابط الهيدروچينية على درجة عالية من التخصص حيث يقترن دائماً الثيمين (T) مع الأدينين (A) برابطتين هيدروچينيتين (A=T) بينما يرتبط الجوانين (G) مع السيتوسين (C) بثلاثة روابط هيدروچينية (G ≡ C) ، ومع ذلك فان هذه الروابط ضعيفة يمكن كسرها.

٢- يعمل كل خيط من الخيطين الأبويين كخيط مطبعى او قالب (Template) لتكوين خيط جديد من الـــDNA وذلك من خلال الاقتران بين القواعد المكملة .

وعلى الرغم من أن هذه الطريقة لتضاعف الـــDNA تقدم الوسيلة التى يتم بها نسخ المعلومات الوراثية من جزيئات الـــDNA الأبوية (القديمة) وتكوين جزيئات جديدة من الـــDNA فانه نشأ تساؤل: هل يتضاعف الـــDNA بالطريقة المحافظة (Conservative replication) بحيث يظل الخيطين الأبويين القديمين (Old) معاً ويكون الخيطين الجديدين (New) حلزون مزدوج جديد أم يتم التضاعف بالطريقة نصف المحافظ (Semi-conservative replication) والتى ينتج عنها تكوين جزيئين من الـــDNA يحتوى كل جزىء منها على خيط قديم (Old) وخيط جديد (New) من الـــDNA (شكل ١٠) .



شكل (١٠) : آلية تضاعف الــDNA التى أقترحها العالمين واطسون (Watson) وكريك (Crick) بالطريقة نصف المحافظة.

ولقد أكدت الأبحاث أن تضاعف الـــDNA يتم بالطريقة نصف المحافظ وفيما يلى الدليل على ذلك من خلال التجربة الرائدة والكلاسيكية التى أجراها العالمين M. Meselson و F. Stahl وذلـــك باســـتخدام النيتروچين الثقيل Heavy (^{15}N) لتعليم وتمييز جزيئات الـــDNA الجديدة (New) عن تلـــك القديمـــة (Old) والتى تحتوى على النيتروچين الخفيف light (N) وبذلك يمكن التمييز بـــين طـــرز جزيئـــات الـــDNA التالية:

١- جزيئات الـــDNA التى تحتوى على النيتروچين الخفيف فى كلا الخيطين ($^{14}N^{14}N$) .
٢- جزيئات الـــDNA التى تحتوى على النيتروچين الثقيل فى كلا الخيطين ($^{15}N^{15}N$).
٣- جزيئات الـــDNA الهجينية (Hybrid) التى يحتوى أحد الخيطين على النيتـــروچين الخفيـــف ويحتوى الخيط الآخر على النيتروچين الثقيل ($^{15}N^{14}N$).

وهذه الجزيئات المختلفة يمكن تمييزها عن بعضها باستخدام الطرد المركزى لهذه الجزيئات فى محلول كلوريد السيزيوم متدرج التركيز حيث يتجمع كل طراز منها فى موقع محدد من أنبوبة الطـــرد المركزى بحيث يتناسب تركيزها مع تركيز محلول كلوريد السيزيوم. وتتلخص الطريقة التى استخدمها هذين العالمين فى الخطوات التالية (شكل ١١).

١. تنمية البكتيريا *E. coli* على بيئة غذائية تحتوى على أملاح أمونيوم (Ammonium salts) مجهزة بالنيتروچين الثقيل (^{15}N) لعديد من الأجيال وبذلك تصبح البكتيريا النامية محتوية على جزيئات الـــDNA معلمة بالنيتروچين الثقيل فى كلا خيطى الـــDNA ($^{15}N^{15}N$).
٢. أخذ عينة من الخلايا السابقة وتركها تنمو لمدة جيل واحد (F_1) على بيئة غذائية تحتوى على النيتروچين الخفيف (^{14}N).
٣. أخذ عينة أُخرى من البكتيريا النامية على البيئة الأولى وتركها تنمو لمدة جيلين (F_2) على بيئة تحتوى على النيتروچين الخفيف (^{14}N).

٤. عزل جزيئات الـــDNA من البكتيريا النامية على البيئات الغذائية وتقدير مستوى ترسيبها وتكوين حزم (Bands) في أنبوبة الطرد المركزى التى تحتوى على محلول متدرج التركيز من كلوريد السيزيوم وتتلخص النتائج التى حصلا عليها فيما يلى:

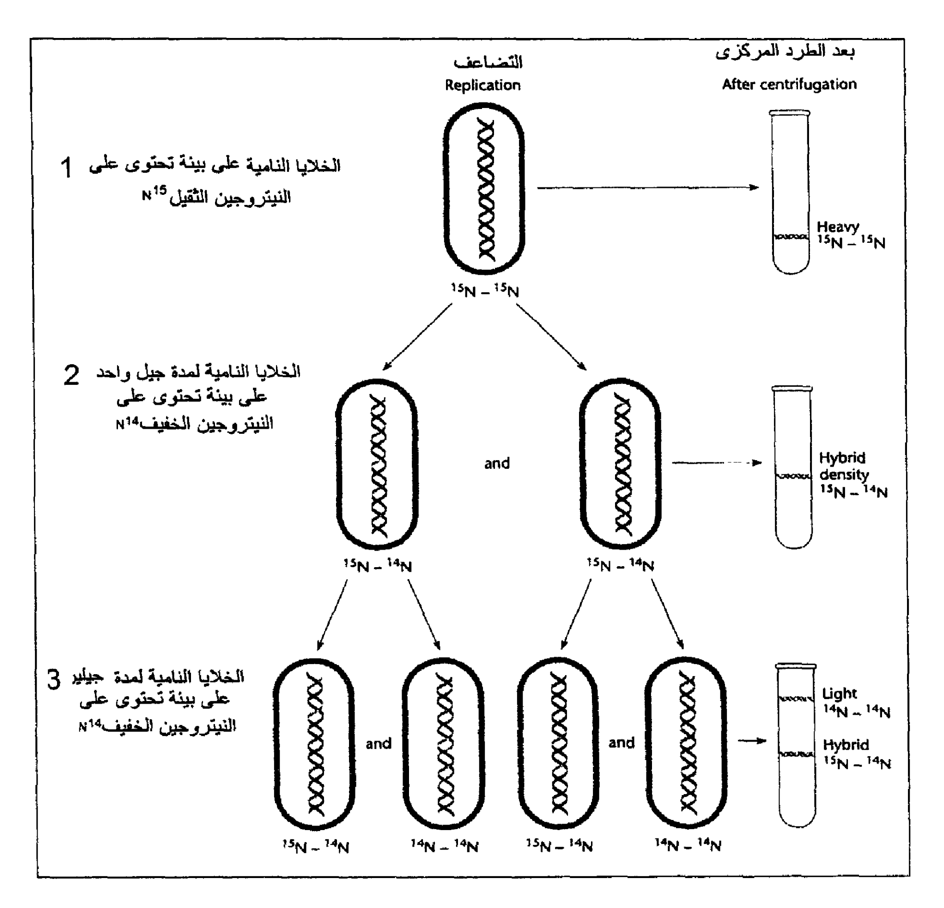
١) جزيئات الـــDNA المعزولة من البكتيريا التى نُميت على البيئة التى تحتوى على النيتـروچين الثقيل كونت حزمة (Band) واحدة قريبة من أسـفل الأنبوبـة بمـا يتناسـب مـع تركيزهـا (شكل ١١).

٢) جزيئات الـــDNA المعزولة من بكتيريا الجيل الأول (F_1) كونت حزمة واحدة أيضاً فى وسط الأنبوبة (شكل ١١).

٣) جزيئات الـــDNA المعزولة من بكتيريا الجيل الثانى (F_2) كونت حزمتين (2 bands) أحدهما قريبة من أعلى الأنبوبة والأخرى فى وسط الأنبوبة فى مستوى يماثل مستوى الحزمة المتكونة من جزيئات الـــDNA المعزولة من بكتيريا الجيل الأول F_1 (شكل ١١).

وهذه النتائج تتفق وتنسجم مع تضاعف الـــDNA بالطريقة نصف المحافظ كما هو مبين بالرسم التوضيحى (شكل ١١). ومما يؤكد ولا يدع مجالاً لأى شك أنه إذا تضاعف الـــDNA بالطريقة المحافظة لأظهرت جزيئات الـــDNA المعزولة من بكتيريا الجيل الأول (F_1) حزمتين أحدهما تحتوى على جزيئات الـــDNA التى تحتوى على النيتروچين الخفيف فى كلا الخيطين الـــDNA ($^{14}N^{14}N$) وسوف تقع فى أعلى الأنبوبة والحزمة الأخرى تحتوى على النيتروچين الثقيل فى كلا خيطى الـــDNA ($^{15}N^{15}N$) وسوف تقع هذه الحزمة بالقرب من أسفل الأنبوبة وهذا لم يحدث ولم يشاهد حيث شوهد حزمة واحدة تمثل الـــDNA الهجينى ($^{15}N^{14}N$) فى موقع متوسط فى أنبوبة الطرد المركزى يقع بين مستوى ترسيب النيتروچين الثقيل فى الخيطين ($^{15}N^{15}N$) ومستوى ترسيب النيتروچين الخفيف فى كلا الخيطين ($^{14}N^{14}N$) كما هو مبين فى (شكل ١١) . وتؤكد هذه النتائج مرة ثانية أن جزىء الـــDNA ذو الحلزون المزدوج (Double helix) يتضاعف بالطريقة نصف المحافظ وليس بالطريقة المحافظة. كذلك أوضحت نتائج التجارب التى أجريت بعد ذلك على الخلايا النباتية فى مزارع الأنسجة

أن تضاعف الـــDNA فى الكائنات حقيقية النواة يحدث أيضاً بالطريقة نصف المحافظ. وعلى ذلك يتضح جلياً أن تضاعف الـــDNA يحدث بالطريقة نصف المحافظ فى كلاً من الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) والكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes).



شكل (١١): تجربة العالمين ميسلسون (Miselson) وستاهل (Stahl) وتفسيرها على أساس تضاعف الـــDNA بالطريقة نصف المحافظة .

شرح شكل (١١)

١ – البكتيريا النامية على بيئة تحتوى على النيتروچين الثقيل (^{15}N) وتكوين حزمة واحدة قريبة من أسفل أنبوبة الطرد المركزى.

٢ – نمو البكتيريات التى تحتوى على النيتروچين الثقيل لمدة جيل واحد (F_1) على بيئة تحتوى على النيتروچين الخفيف (^{14}N) وتكوين حزمة واحدة فى وسط أنبوبة الطرد المركزى.

٣ – نمو البكتيريا التى تحتوى على النيتروچين الثقيل على بيئة تحتوى على النيتروچين الخفيف (^{14}N) لمدة جيلين (F_2) وتكوين حزمتين إحداهما فى نفس مستوى الحالة السابقة والأخرى قريبة من قمة أنبوبة الطرد المركزى.

آلية تضاعف الـDNA — DNA Replication Mechanism

فى السنين التى تلت اكتشاف تضاعف الـــDNA بالطريقة نصف المحافظ كشف عدد آخر من العلماء الغطاء عن عديد من النقاط الهامة والمتعلقة بمتطلبات آلية تضاعف الـــDNA وهى:

١ – تجهيز الحلزون المزدوج (Double helix) للتضاعف وذلك بانفراج الخيطين الأبويين عن بعضهما وتكوين ما يعرف بانبعاج التضاعف (Replication bubble) فى جزء من الحلزون المزدوج . ويحدث هذا الانبعاج عند تتابع معين قصير من النيوكليوتيدات يعرف بمنشأ التضاعف (Replication origin) حيث يرتبط عديد من البروتينات بهذا المنشأ (Origin) وأول بروتين يتعرف على المنشأ ويرتبط به هو البروتين البادىء (Initiator protein) ويساعد فى انجذاب هذا البروتين ونقطة المنشأ إنزيم DNA helicase كما يساعد هذا الإنزيم فى انفصال الخيطين الأبويين عن بعضهما وتكوين انبعاج التضاعف وشوكة التضاعف(Replication fork) وبذلك يستطيع إنزيم البلمرة (DNA polymerase III) استخدام الخيطين الأبويين كمطبعة (Template) لتكوين خيطين جديدين طبقاً لآلية التضاعف نصف المحافظ.

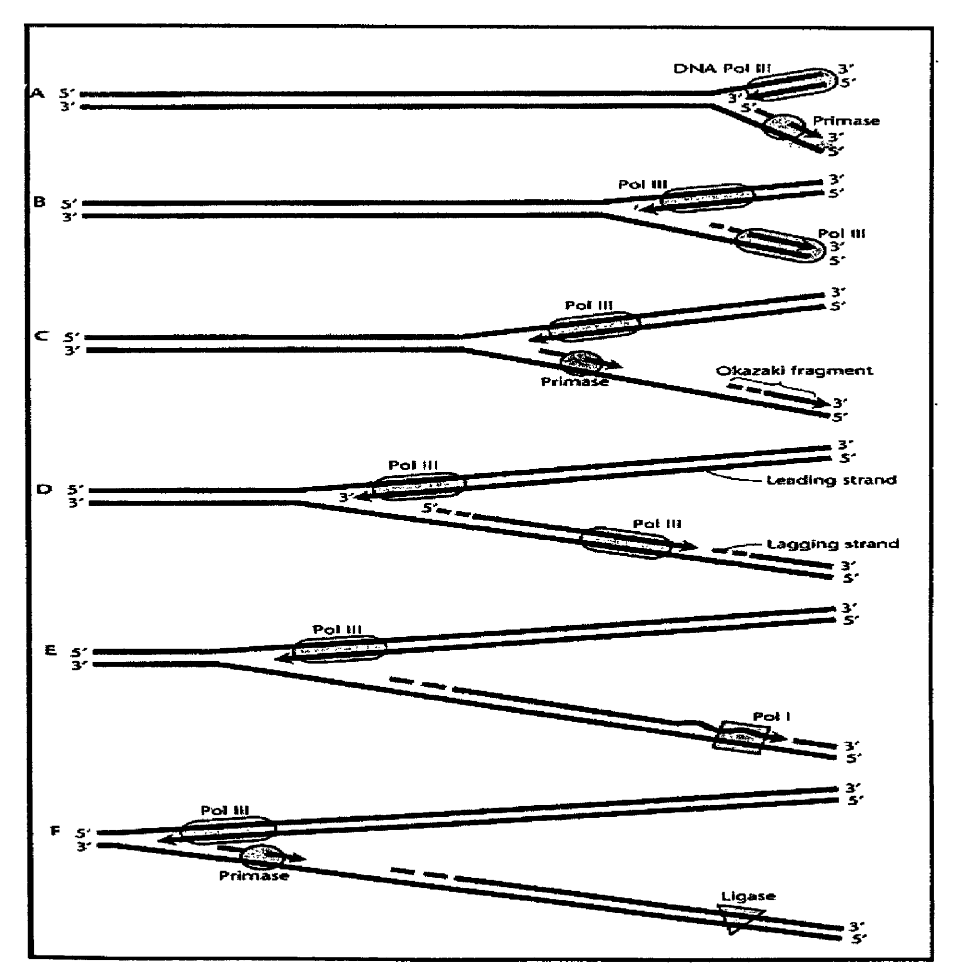
٢- يعتمد التخليق الحقيقى لخيط الـــDNA الجديد على إنزيم البلمرة (DNA polymerase III) حيث يقوم بإضافة النيوكليوتيدات تلو الأخرى الى الطرف $3'$-OH من خيط الـــDNA النامى فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ فقط. ولكى يقوم هذا الإنزيم بهذه المهمة فإنه يحتاج الى المتطلبات التالية:

أ- أن يكون خيط الـــDNA الذى يستخدمه كقالب فى صورة خيط مفرد (Single strand) وليس فى صورة جزىء مزدوج الخيط (Double strand) ويتحقق هذا المطلب بتكوين انبعاج التضاعف.

ب-أن هذا الإنزيم لا يستطيع أن يبدأ (Initiate) تخليق خيط الـــDNA الجديد بنفسه حيث يحتاج الى طرف نامى ($3'$-OH) . بالفعل يمكـــن أن يستخـــدمه لإضـــافة النيوكليوتيدات إليه فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ ويتحقق هذا المطلب بتخليق قطع صغيرة من الـــDNA تسمى بالبادئات (RNA primer) والتى يقوم بتخليقها إنزيم الـــ Primase عند شوكة التضاعف وبذلك تقدم هذه البادئـــــات التى تحـــتوى علـــى الطرفـــ $3'$-OH الوسيـــلة الـــتى يستخدمها إنزيم DNA polymerase III ليبدأ تخليق خيط الـــDNA الجديد فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ عن طريق وضع النيوكليوتيدات فى خيط الـــDNA الجديد من خلال الاقتران بين النيوكليوتيدات المكملة (G ≡ C, A= T) فى كل من الخيط المطبعى او القالب وخيط الـــ DNA الجديد وتكوين الروابط الفوسفودايستر (Phosphodiester) بين هذه النيوكليوتيدات فى خيط الـــDNA الجديد وتسمى هذه العلمية باسم البلمرة (Polymerization).

ج- نظراً لأن إنزيم DNA polymerase III يقوم بتخليق خيط الـــDNA فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ لذلك يقوم هذا الإنزيم باستخدام الخيط الأبوى الذى إتجاهه $5' \rightarrow 3'$ كخيط مطبعى لتكوين الخيط الجديد فى الإتجاه $3' \rightarrow 5'$ بصورة مستمرة ويعرف هذا الخيط النامى بالخيط المتقدم (Leading strand) بينما يستخدم هذا الإنزيم الخيط الأبوى الآخر الذى إتجاهه $5' \rightarrow 3'$ كخيط مطبعي لتكوين الخيط الجديد الأخر بصورة متقطعه (Discontinuous) باستخدام قطع صغيرة من الـــDNA يبلغ طولها ١٠٠٠ نيوكلوتيدة تعرف باسم قطع أوكازاكي (Okazaki fragments) نسبه الي العالم Okazaki

الذي اكتشفها ويقوم بتخليق هذه القطع الصغيرة من الـــDNA هذا الإنزيم في الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ ويعرف هذا الخيط المتكون بصورة متقطعة بالخيط المتكلىء (Lagging strand) والذي سيكون إتجاهه بعد اكتمال تضاعفه في الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ شكل (١٢).



شكل (١٢): يوضح آلية تضاعف الـــDNA بواسطة إنزيم DNA pol III

شـــــرح شـــــكل (١٢)

يقوم إنزيم DNA pol III بتخليق الخيط الجديد المتقــدم (Leading strand) بـصـورة مــستمرة فــي الإتجــاه $3' \longrightarrow 5'$ بينما يقوم بتخليق الخــيط الجديــد المتلكـــيء (Lagging strand) بـصورة منقطعـــة فـــي الإتجــاه $3' \longrightarrow 5'$ باستخدام قطع من الــDNA تسمى بقطع اوكازاكى (Okazaki fragments).

يقوم إنزيم الـبلمرة DNA polymerase I بوظيفتين احدهما إزالة البادئات (RNA primers) عن طريـــق كـــسر الرابطة الفوسفوديستر (Phosphodiesters) بين البادئ (RNA primer) وقطع اوكازاكي وفي نفس الوقت يقــوم بالوظيفة الثانية وهي إحلال قطع من الـــDNA بدلا من البادئ من خلال الاقتران بين النيوكلوتيدات المكملة في كل من الخـــيط المطبعـــي وخـــيط الـــــDNA الجديـــد $(G \equiv C , A{=}T)$.

يقوم إنزيم الـــDNA ligase بوصل أو لحم (Seals) قطع اوكازاكي مع بعضها وكذلك الفجوات الأخري الناشئة من إزالة البادئ واحلالها بقطع من الـــDNA من خلال تكوين الرابطة فوسفودايستر وبذلك يتكون خيطين جديدين كاملين من الــDNA.

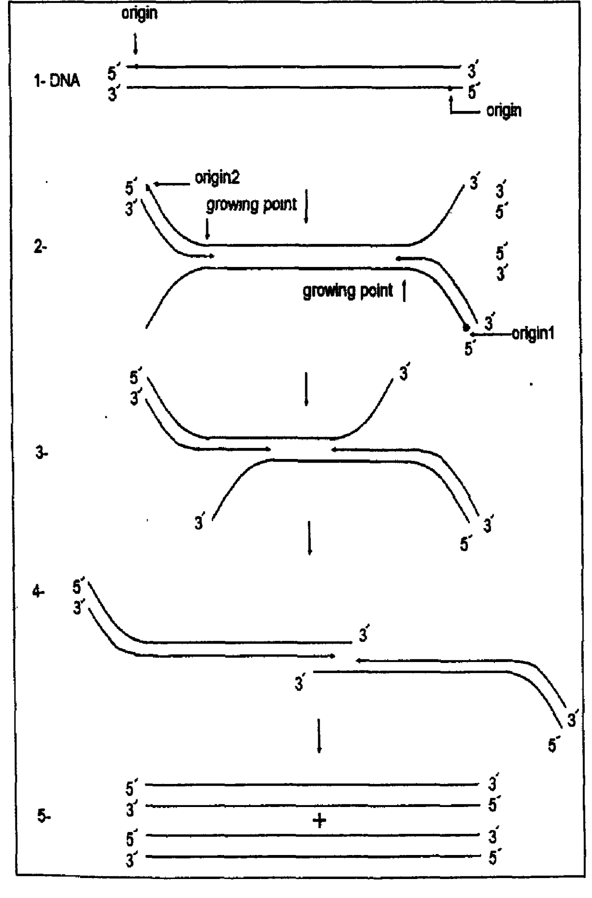
وبالأخذ في الاعتبار هذه النقاط السابقة وطبيعة جزيء الــDNA سواء كان خيطي (Linear DNA) أو دائري (Circular DNA) وضعت عديد من الآليات (Mechanisms) لتضاعف جزيء الـــDNA وهي علي النحو التالي :

أولاً: آلية التضاعف المستمر أحادي الإتجاه

Unidirectional Continuous Mechanism

وفي هذه الآلية يوجد نقطتين لمنشأ التــضاعف (Replication origin) عنـــد طرفـــي جـــزئ الـــDNA يوضع عندهما البادئات (RNA primers) التي يستخدمها إنزيم الـــ DNA polymerase III لتكوين خيطين جديدين ابتداء من نقاط المنشأ (Origin) حيث يستخدم الخيط الابوي الـــذي إتجاهــه $5' \longrightarrow 3'$ لتكوين الخيط الجديد في الإتجاه $3' \longrightarrow 5'$ وبصورة مستمرة كما يستخدم الخيط الابـــوي الآخر الذي إتجاهه $3' \longrightarrow 5'$ أيضاً لتكوين خيط الـــ DNA الجديد الاخـــر فـــي الإتجـــاه $5' \longrightarrow 3'$ وبصورة مستمرة أيضاً طبقا لآلية التضاعف نصف المحافظ وبذلك يتم تخليق الخيطين الجديدين مـــن

الـــDNA بصورة مستمرة وفى إتجاه واحد (Unidirectional) من نقطى المنشأ عند طرفى الـــDNA (شكل ١٣) . ويتضاعف بهذه الآلية جزئيات الـــDNA الفيرسية الخطيـــة (Linear DNA) مثـــل الادينوفيرس (Adenovirus) حيث يعمل طرفي الـــDNA كنقـــاط منـــشأ (Origin) يبـــدأ منهمـــا التضاعف وتخليق خيطين جديدين من الـــDNA بصورة مستمرة وفي إتجاه واحد من نقطتي المنشأ.



شكل (١٣): آليـــة التـــضاعف المـــستمر أحادى الإتجاه

Unidirectional continuous mechanism

١-الحلزون المزدوج الأبوى الذى يحتوى علـــى نقطتين لمنشأ التضاعف origin عنـــد طرفـــى الخيطين الأبويين.

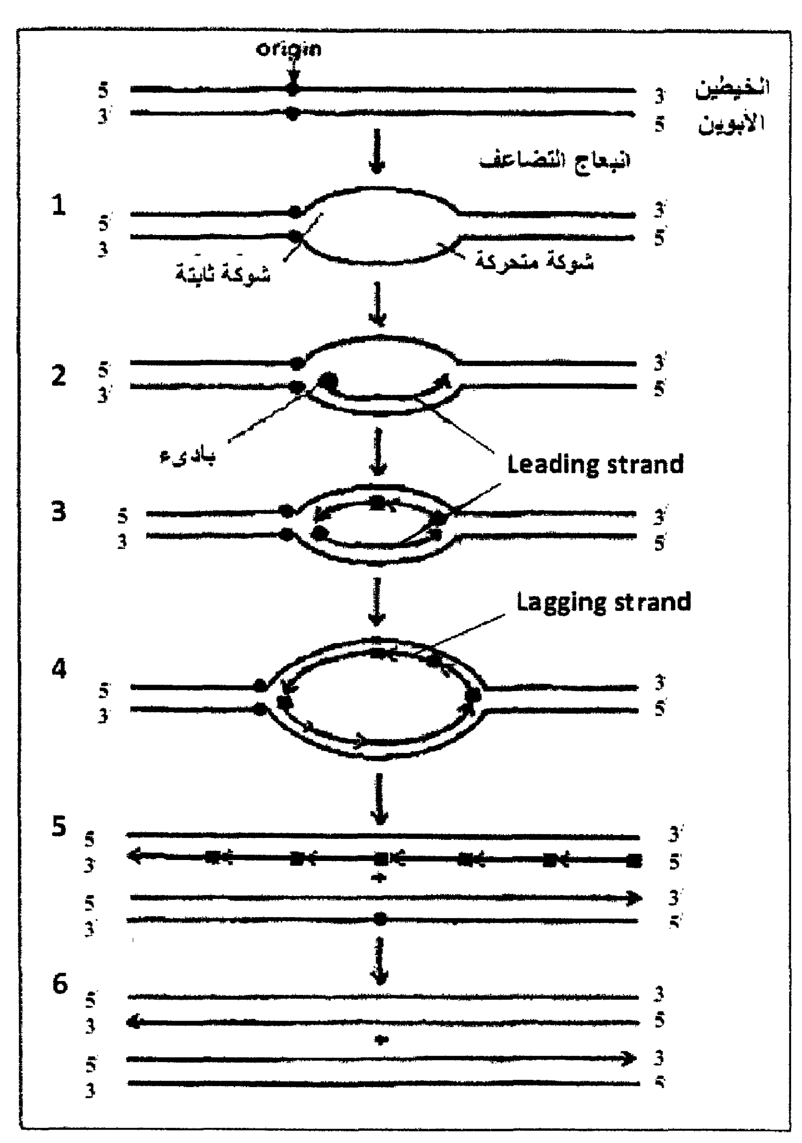
٢- إنفصال الخيطين الأبويين عن بعضهما عند الطرفين وابتداء تخليق الخيطين الجديـــدين فـــى الإتجاه ′3 ـــ ′5 بصورة مـــستمرة كمـــا فـــى الخطوات الثالثة والرابعة.

٥-انتهاء تخليق الخيطـــين الجديـــدين وتكـــوين حلزونين مزدوجين من الـــDNA تحتـــوى كـــل منهما على خيط أبوى وخيط جديد طبقاً لتضاعف الـــDNA نصف المحافظ.

ثانيا: آلية التضاعف نصف المتقطع احادي الإتجاه

Unidirectional Semidiscontinuous Mechanism

وفي هذه الآلية يوجد نقطة منشأ (Origin) واحدة يتكون عندها انبعاج التضاعف وشوكتين (2 Forks) للتضاعف علي جانبي الانبعاج احدهما شوكة ثابتة (Stationary fork) ملاصقة لنقطة المنشأ والاخري متحركة (Moving fork) علي الجانب الأخر من الانبعاج ويحدث تخليق خيطي الـDNA الجديدين بهذه الآلية باستخدام إنزيم DNA polymeraseIII البادئات (RNA primers) في الإتجاه $5' \leftarrow 3'$ حيث يستخدم الخيط الأبوي الذي إتجاهه $3' \leftarrow 5'$ لتكوين الخيط المتقدم (Leading strand) بصورة مستمرة كلما تقدمت شوكة التضاعف المتحركة بعيدا عن نقطة المنشأ وكذلك يستخدم هذا الإنزيم الخيط الابوي الذي إتجاهه $5' \leftarrow 3'$ كمطبعة لتكوين الخيط الجديد المتلكئ (Lagging strand) بصورة متقطعة في الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ بواسطة قطع اوكازاكي كلما تقدمت شوكة التضاعف المتحركة بعيدا عن نقطة المنشأ . وبهذه الآلية يتم تخليق الخيط المتقدم بصورة مستمرة بينما يتم تخليق الخيط المتلكئ بصورة متقطعة في إتجاه واحد (Unidirectional) من نقطة المنشأ (Origin) ويتضاعف بهذه الآلية البلازميدات البكتيرية (شكل ١٤).



شكل (١٤) : يوضح آلية التضاعف نصف المنقطع أحادى الإتجاه

Unidirectional semi discontinuous mechanism

شرح شكل (١٤)

١- انفصال الخيطين الأبويين عند نقطة المنشأ (Origin) وتكوين انبعاج التضاعف وشوكتى (2 Forks) التضاعف أحدهما ثابتة وهى القريبة من نقطة المنشأ والأخرى متحركة.

٢- تخليق خيط الـــDNA الجديد المتقدم (Leading strand) فى الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ بصورة مستمرة.

٣- تخليق خيط الـــDNA الجديد المتلكىء (Lagging strand) فى الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ بصورة منقطعة.

٤- حركة شوكة التضاعف (Fork) المتحركة بعيداً عن نقطة المنشأ واستمرار التخليق فى كلا الخيطين الجديدين بصورة مستمرة فى الخيط الجديد المتقدم وبصورة منقطعة فى الخيط الجديد المتلكىء.

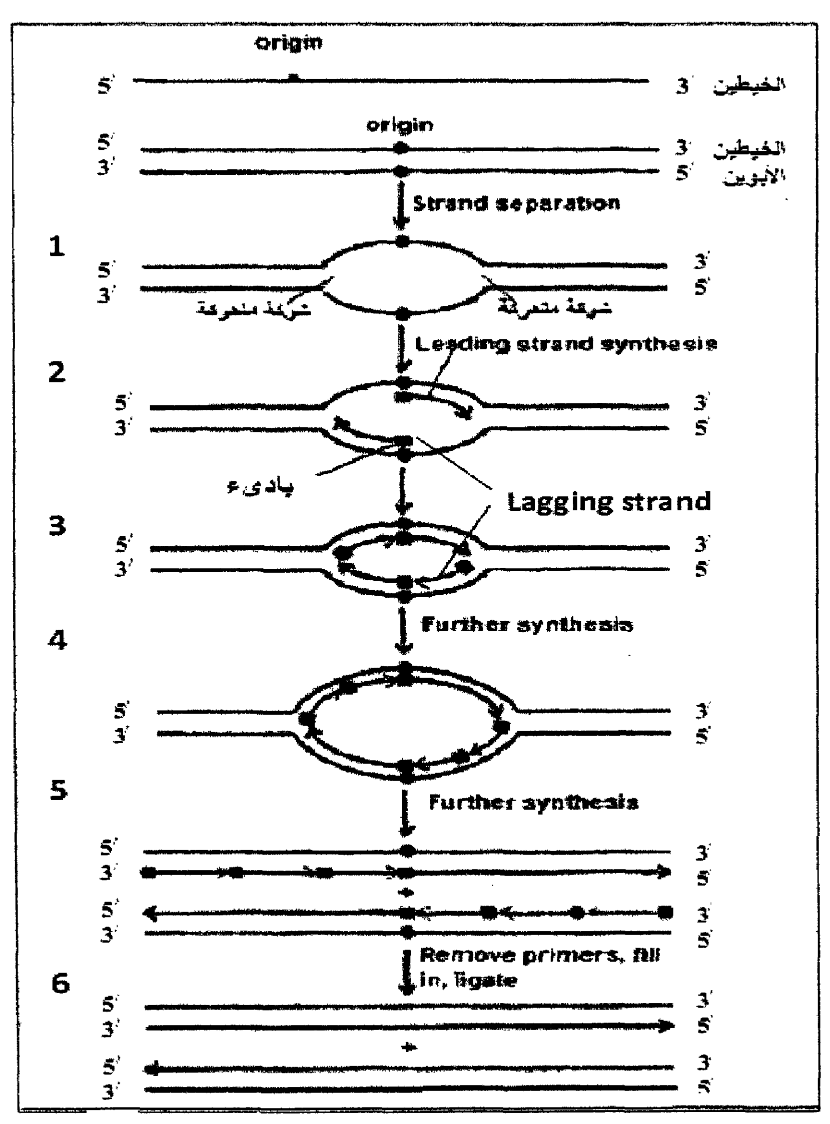
٥- انتهاء تخليق الخيطين الجديدين داخل انبعاج التضاعف.

٦- إزالة البادئات (RNA primer) وملأ الفجوات والتحامها وبذلك يتكون حلزونين مزدوجين من الـــDNA كل منهما يحتوى على خيط أبوى وخيط جديد طبقاً التضاعف نصف المحافظ.

ثالثاً: آلية التضاعف نصف المتقطع ثنائي الإتجاه

Bidirectional Semidiscontinuous Mechanism

وفي هذه الآلية يبدأ التضاعف من نقطة منشأ (Origin) واحده ويتكون انبعاج التضاعف وكذلك شوكتي التضاعف(2 Fork) علي جانبي الانبعاج وتتحركان في الإتجاهين المتضادين (Bidirectional) من نقطة المنشأ (شكل ١٥). وفي هذه الآلية يقوم إنزيم الـــDNA polymerase III بتخليق الخيط المتقدم بصورة مستمرة علي يمين نقطة المنشأ وبصورة متقطعة علي شمال نقطة المنشأ بينما يقوم الإنزيم بتكوين الخيط المتلكئ بصورة مستمرة علي شمال نقطة المنشأ وبصورة متقطعة علي يمين نقطة المنشأ في الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ في كلا الخيطين الجديدين مستخدماً الخيط المطبعي الابوي الذي إتجاهه $3' \rightarrow 5'$ كمطبعة لتكوين الخيط المتقدم الذي إتجاهه $5' \rightarrow 3'$ بينما يستخدم الخيط الأبوى الآخر الذى إتجاهه $5' \rightarrow 3'$ لتخليق الخيط الجديد المتلكىء الذى إتجاهه $5' \rightarrow 3'$. ولقد أكدت الأبحاث أن هذه الآلية لتضاعف الـــDNA تحدث في الكائنات حقيقة النواة (Eukaryotes) والكائنات غير حقيقة النواة (Prokaryotes) ذات الكروموسومات الطولية (Linear chromosome).



شكل (١٥) : آلية التضاعف نصف المنقطع ثنائى الإتجاه

Bidirectional semi discontinous mechanism

شرح شكل (١٥)

١- انفصال الخيطين الأبويين عند نقطة المنشأ (Origin) وتكوين انبعاج التضاعف وشوكتى (2 Froks) التضاعف المتحركتان بعيداً عن نقطة المنشأ.

٢- تخليق الخيط الجديد المتقدم (Leading) فى الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ يمين نقطة المنشأ وتخليق الخيط الجيدي المتلكىء (Lagging) فى الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ بصورة مستمرة شمال نقطة المنشأ.

٣- استمرار تخليق الخيط الجديد المتقدم بصورة مستمرة يمين نقطة المنشأ وبصورة منقطعة شمال نقطة المنشأ وكذلك استمرار تخليق خيط الـــDNA الجديد المتلكىء بصورة مستمرة شمال نقطة المنشأ وبصورة متقطعة يمين نقطة المنشأ.

٤ ، ٥ - استمرار التخليق فى كلا الخيطين الجديدن بنفس الآلية السابقة حتى إنتهاء التضاعف داخل انبعاج التضاعف.

٦-إزالة البادئات (RNA primers) وملأ الفجوات والتحامها وبذلك يتكون حلزونين مزدوجين كل منهما يحتوى على خيط أبوى وخيط جديد.

رابعاً: آلية التضاعف المستمر ثنائى الإتجاه

Bidirectional continous mechanism

وتحدث هذه الآلية في جزئيات الـــDNA البكتيريةالدائرية (Circular DNA) وكذلك البلازميدات البكتيريةالدائرية وبعض الفيروسات حيث تكفى نقطة منشأ (Origin) واحدة ينفصل عندها الخيطين الأبويين عن بعضهما وتكوين شوكتى (2forks) التضاعف على جانبى الانبعاج ثم يقوم إنزيم الـــDNA polymerase III باستخدام الخيطين الأبويين الدائريين كمطبعة لتكوين خيطيين جديدين دائريين فى الإتجاه $5' \longrightarrow 3'$ وبصورة مستمرة على طول شوكتى التضاعف فى الإتجاهيين المتضادين من نقطة المنشأ حتى ينتهى تضاعف الـــDNA الدائرى وتكوين خيطين جديدين طبقا لآلية التضاعف نصف المحافظ (شكل ١٦).

ويستخدم اصطلاح ريبليكون (Replicon) ليشير الى الوحدة التضاعفية (Replication unit) التي تضم منشأ التضاعف وانبعاج التضاعف وشوكتي التضاعف حيث تستخدم هذه المكونات في تخليق خيط الـ DNA المتقدم وكذلك خيط الـ DNA المتكلئ سواء كان التضاعف احادي الإتجاه (Unidirectional) او ثنائي الإتجاه (Bidirectional) من نقطة المنشأ (Origin) باستخدام الإنزيمات التالية :

١- إنزيم DNA helicase الذي يساعد في ارتباط البروتين البادىء بنقطة المنشأ (Origin) وكذلك انفصال الخيطين الابويين عن بعضهما وتكوين انبعاج التضاعف الذي يتم بداخله تخليق الخيطين الجديدين من الـDNA .

٢- إنزيم الـPrimase والذي يقوم بتخليق البادئات (RNA primers) والتي يستخدمها إنزيم الـ DNA polymeraseIII لبدأ تخليق خيطي الـ DNA الجديدين .

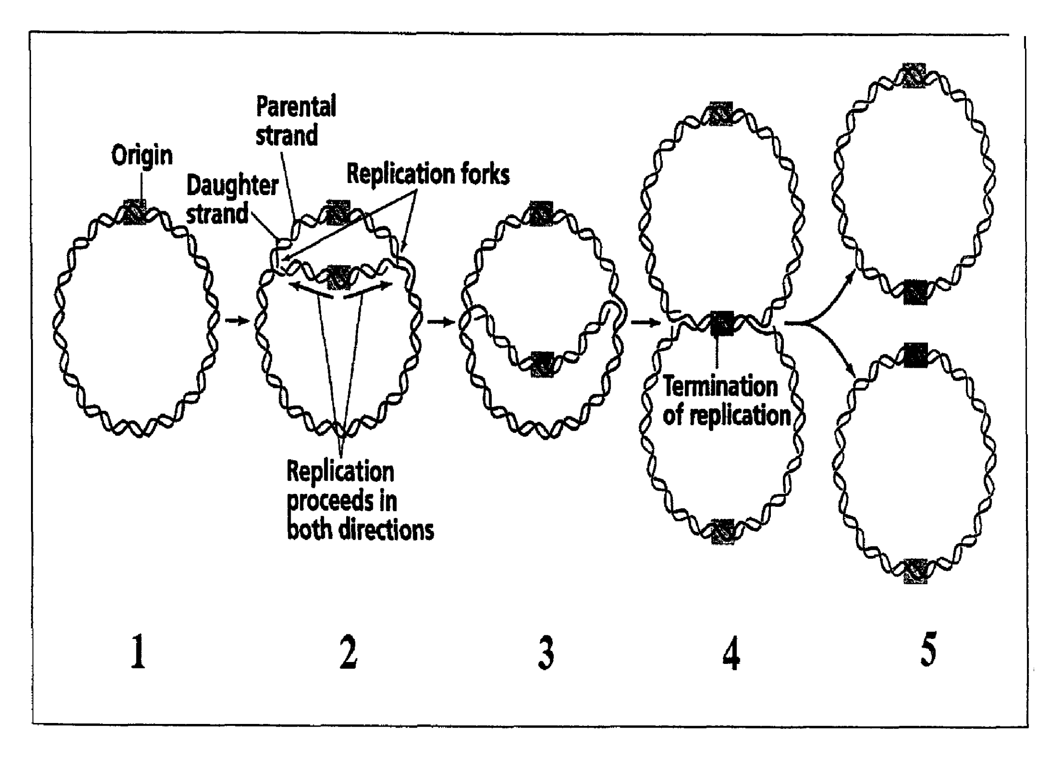
٣- إنزيم الـDNA polymerase III والذي يقوم بتخليق الخيطين الجديدين من الـDNA في الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ باستخدام الخيطين الأبويين.

٤- إنزيم الـDNA polymeraseI والذي يقوم بإزالة البادئات(RNA primers)وإحلالها بقطع من الـDNA

٥- إنزيم الـDNA ligase والذي يقوم بوصل او لحم (Seals) قطع اوكازاكي ببعضها عن طريق تكوين الروابط الفوسفودايستر بين هذه القطع وكذلك تكوين هذه الروابط بين قطع الـDNA التي حلت محل البادئات (RNA primers) فى خيط الـDNA المتكون.

وفي الكائنات حقيقة النواة (Eukaryotes) ذات الكروموسومات الطويلة يتضاعف جزئيات الـDNA بها عن طريق عديد من الريبليكونات (Multiriplicons) وذلك لاحتوائها علي عديد من نقاط المنشأ (Multiorigins) والتي يبدأ منها التضاعف في كل ريبليكون (Replicon) بصورة مستقلة عن الآخر حيث شوهد بالميكروسكوب الاليكتروني عديد من الانبعاجات في الكروموسوم الواحد أثناء تضاعفه وبتقدم تضاعف هذه الريبليكونات (Replicons) العديدة في تضاعفها تتصل ببعضها في النهاية ويكتمل بذلك تضاعف الـDNA الطويل في هذه الكروموسومات الطويلة .

بينما في الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) مثل البكتيريا يتم تضاعف الكروموسوم البكتيري المفرد في صورة ريبليكون واحد (Single replicon) وذلك لاحتوائه علي نقطة منشأ (Origin) واحده والتي منها يبدأ التضاعف وتكوين انبعاج التضاعف وشوكتي التضاعف واللتان تتحركان في إتجاهين متضادين (Bidirectional) من نقطة المنشأ (Origin) وبصورة مستمرة في كلا الإتجاهين من نقطة المنشأ وعلي ذلك يتضاعف الكروموسوم البكتيري بآلية التضاعف المستمر ثنائي الإتجاه (Bidirectional continuous replication)



شكل (١٦) : يوضح آلية التضاعف المستمر ثنائى الإتجاه
Bidirectional continuous mechanism

شرح شكل (١٦)

١- الحلزون المزدوج من الـــDNA الدائرى الذى يحتوى على نقطة منشأ (Origin) للتضاعف واحدة.

٢- انفصال الخيطين الأبويين الدائريين عن بعضهما وتكوين انبعاج التضاعف وشوكتى (2 Forks) التضاعف المتحركتان فى الإتجاهيين من نقطة المنشأ وامتداد تخليق الخيطين الجديدين فى الإتجاه $3' \longrightarrow 5'$ بصورة مستمرة.

٣- استمرار حركة شوكتى التضاعف بعيداً عن نقطة المنشأ واستمرار تخليق الخيطين الجديدين بين الدائريين بصورة مستمرة فى الإتجاه $3' \longrightarrow 5'$.

٤- استمرار حركة شوكتى التضاعف فى الإتجاهين بعيداً عن نقطة المنشأ واستمرار تخليق الخيطين الجديدين الدائريين بصورة مستمرة.

٥- انتهاء التضاعف وتكوين حلزونين مزدوجين دائرين من الـــDNA .

الباب الثانى

الچينات

The Genes

مفهوم الچين Gene Concept

من وجهة النظر الكلاسيكية أو التقليدية تحتل الچينات مواقع محددة على الكروموسومات ومع ذلك يمكن تعريف الچين بأى من المفاهيم التالية:

١- الچين هو وحدة إعادة تكوين التراكيب الوراثية(Recombinational unit) ويشير هذا المفهوم الى أن الچينات تمثل مواقع محددة وثابتة على الكروموسومات والتى يمكن أن تنفصل عن بعضها عن طريق العبور (Crossingover) وتكوين تراكيب وراثية جديدة ويمكن تحديد مواقع الچينات المرتبطة على الكروموسومات بأستخدام بعض الطريق الوراثية.

٢- الچين هو وحده الوظيفة (Functional unit) ويشير هذا المفهوم الى أن الچين يكون مسئولاً عن تكوين شكل مظهرى (Phenotype) معين ويجب أن يقوم الچين بهذه الوظيفة فى كل الخلايا التى يجب أن يظهر فيها هذا الشكل المظهرى.

٣- الچين هو وحدة الطفور (Mutational unit) ويشير هذا المفهوم الى أن الچين يمكن أن يطفر وذلك بحدوث تغير مستديم فى الچين والذى يعرف بالطفرة وهذا التغيير المستديم فى الچين (الطفره) يورث الى النسل.

ومع ذلك فإن هذه المفاهيم الثلاثة لتعريف الچين ليس من الضرورى أن تشير الى نفس الوحدة التركيبية (Unit of structure) فعلى سبيل المثال يرجع التغير فى بروتين الجلوبين الطافر عن الجلوبين الطبيعى الى حدوث تغير فى زوج واحد من القواعد فى چين الجلوبين الطافر. ويتركب بروتين الجلوبين الطبيعى من سلسلتين ألفا (2 α chain) عديدة الببتيد متماثلتين يتركب كل منها من ١٤١ حامض أمينى و سلسلتين بيتا (2 β chain) عديدة الببتيد متماثلتين يتركب كل منها من ١٤٦ حامض أمينى.

بينما يتركب بروتين الجلوبين الطافر من نفس التركيب السابق مع إحلال الحامض الأمينى ڤالين السادس فى السلسلة β لبروتين الجلوبين الطافر محل الحامض الأمينى الجلوتاميك فى بروتين الجلوبين الطبيعى ووجد أن الشفرة الوراثية (Genetic code) للحامض الأمينى الجلوتاميك هى GAG بينما الشفرة الوراثية للڤالين هى GTG وتختلف الشفرتان عن بعضهما فى إحلال زوج واحد من القواعد. وهذا يؤكد أن مفهوم الچين كوحدة وظيفة أو وحدة إعادة تكوين تراكيب وراثية أو وحدة طفور لا يشير الى نفس الوحدة التركيبية مما دعا العلماء النظر مرة أخرى للچين بصورة أكثر دقة من حيث المفاهيم الثلاثة سابقة الذكر.

وقبل التطرق لمعرفة التركيب الدقيق للچين يجب الإشارة الى الاختبار العملى الذى يستخدم فى تحديد التركيب الدقيق للچين وهو اختبار التكامل (Complementation test) أو اختبار التجاذب والتنافر (Cis / Trans test) ويجرى هذا الاختبار لتحديد وقوع طفرتين متنحيتين (m_2 , m_1) فى نفس الچين بمعنى أنها طفرات أليليه (Allelic) أو وقوعهما فى چينين مختلفين بمعنى أنها طفرات غير أليليه (Non-allelic). وبإفتراض أن الطفرتين المتنحيتين هما m_1 وm_2 فإن وضع الطفرتين على الكروموسومين المتماثلتين(Homologous chromosomes) يصبح فى صورة من الصورتين التاليتين:

١- إما أن تقع الطفرتان المتنحيتين m_1 , m_2 على نفس الكروموسوم وتقع الأليلات الطبيعية m_1^+ , m_2^+ على الكروموسوم المماثل ويعرف بالوضع التجاذبى(Cis position) كما يلى:

m_1	m_2
m_1^+	m_2^+

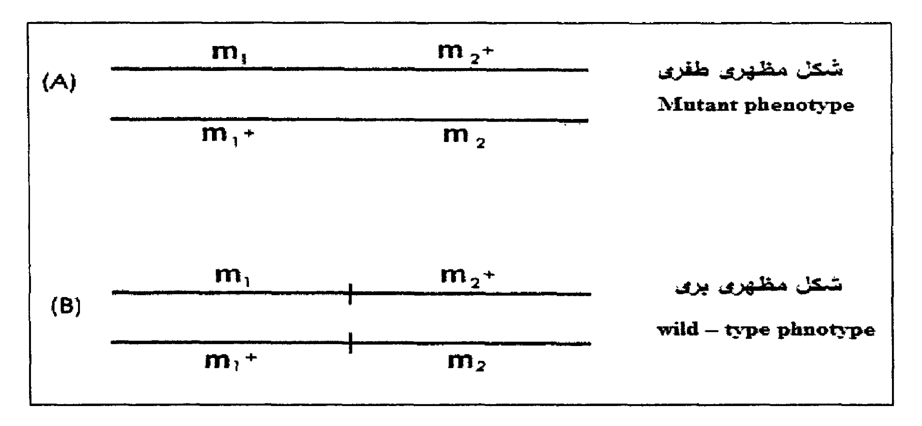
٢- أو أن تقع إحدى الطفرتين على أحد الكروموسومين المتماثلين وتقع الطفرة الأخرى على الكروموسوم الآخر ويعرف بالوضع التنافرى (Trans-position) كما يلى:

m_1	m_2^+
m_1^+	m_2

وتعتمد الفكرة الأساسية التى بنى عليها هذا الاختبار العملى على الحقيقة العلمية الراسخة وهى أن الچين من الناحية الوظيفية ينسخ (Transcription) ويترجم (Translation) الى نوع واحد من السلاسل عديدة الببتيد (Polypeptide chain)

One Gene ⟶ One polypeptide chain

فإذا كانت الطفرتين المتنحيتين m_2 , m_1 تقعان فى نفس الچين أى أنها طفرات أليليه (Allelic) يكون الشكل المظهرى للفرد الخليط فى الطفرتين ذو مظهر طفرى (Mutant type) وذلك لعدم حدوث التكامل بين الطفرتين، بينما إذا كانت الطفرتين تقعان فى چينين مختلفين يكون الشكل المظهرى للفرد الخليط فى الطفرتين ذو مظهر برى وذلك لحدوث التكامل (Complementation) بين الطفرتين (شكل ١٧)



شكل (١٧): يوضح اختبار التكامل للفرد الخليط فى الطفرتين فى الوضع التنافرى (Trans position)

(A) إذا كانت الطفرتين m_1 , m_2 فى نفس الچين (طفرات أليليه) فإنه لا يحدث تكامل ويكون الشكل المظهرى للفرد الخليط والحامل للطفرتين ذو شكل مظهرى طفرى (Mutant type) .

(B) إذا كانت الطفرتين m_1 , m_2 فى چيني مختلفين (طفرات غير أليليه) فسوف يحدث تكامل بينهما ويكون الشكل المظهرى للفرد الخليط للطفرتين ذو شكل مظهرى برى (Wild- type).

شروط إجراء هذا الاختبار

١- أن يكون الكائن تحت الدراسة ثنائى (Diploid) للطفرتين .

٢- أن يكون الكائن تحت الدراسة خليط (Heterozygous) للطفرتين .

٣- أن تكون الطفرتان تحت الدراسة فى الوضع التنافرى (Trans–position) .

ويمكن إجراء هذا الاختبار من الناحية العملية فى الكائنات الراقية الثنائية عن طريق التهجين بين الطفرتين للحصول على نسل الجيل الأول F_1 وتحليل النسل الناتج فإذا كان النسل الناتج من تهجين الطفرتين m_2 , m_1 ذو مظهر طفرى (Mutant type) فإن ذلك يدل على أن الطفرتين تقعان فى نفس الچين أما كان النسل الناتج من تهجين الطفرتين m_2 , m_1 ذو مظهر برى فإن ذلك يدل على أن الطفرتين تقعان فى چينين مختلفين.

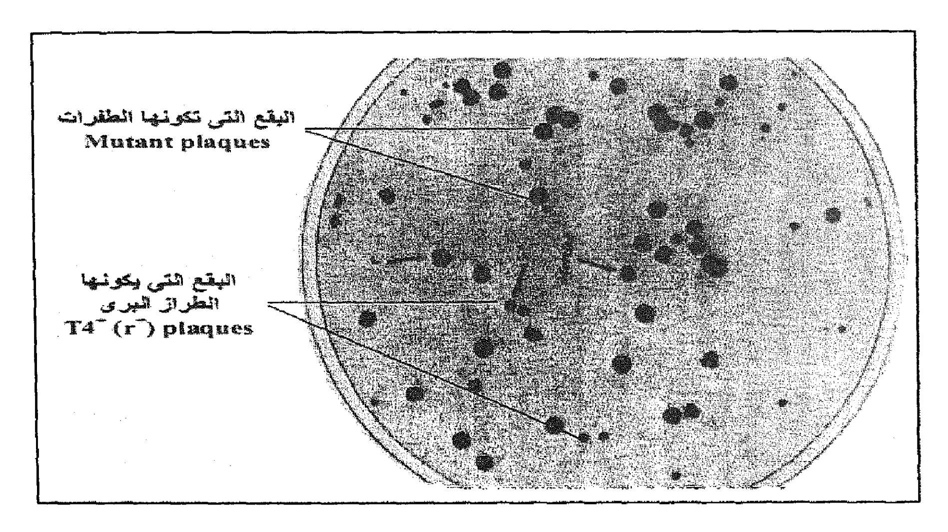
ويمكن أيضاً تطبيق هذا الاختبار على الطفرات التى تحدث فى البكتريوفاج (Bacteriophage) عن طريق العدوى المختلطة (Mixed infection) للطفرتين فى نفس الوقت للخلايا البكتيرية العائلة وبذلك يتحقق شروط هذا الاختبار سابقة الذكر.

التركيب الدقيق للچين Fine structure of the Gene

فى منتصف الستينات من القرن العشرين قام العالم Seymour Benzer بإجراء تحليل وراثى لچين فى البكتريوفاج T_4 مقدماً بذلك أول صورة حقيقية عن التركيب الدقيق للچين. فعندما يهاجم البكتريوفاج البرى (Wild-type T_4) البكتيريا *E. coli* فإنه يتكاثر بداخل الخلايا البكتيرية وفى النهاية يحللها ويتحرر حوالى ٣٠٠ جزئ ڤيرسى جديد لكل خلية بكتيرية مسبباً ذلك تكوين مساحة رائقة فى البيئة الغذائية لا تحتوى على اى خلايا بكتيرية ولكنها تحتوى فقط على جزيئات ڤيرسية (T_4) من الطراز البرى وهذه المساحات الرائقة أو البقع المتكونة سميت باسم (Plaques). ولقد وجد بنزر Benzer أن الطراز البرى من البكتريوفاج T_4 (T_4^+) يأخذ عدة ساعات من مهاجمته للبكتيريا *E. coli* لتكوين هذه البقع (Plaques) ويعتبر تكون هذه البقع هو الشكل المظهرى (Phenotype) الذى يكونه الطراز البرى من البكتريوفاج (T_4^+) عند مهاجمته للبكتيريا *E. coli* وتتميز هذه البقع بأنها صغيرة الحجم وذات حواف متعرجة(شكل ١٨).

ولقد قام بنزر (Benzer) بدراسة طفرات فى البكتريوفاج والقادرة على إحداث تحلل سريع (Rapid lysis) للبكتيريا *E. coli* فى حوالى ٢٠ دقيقة من العدوى ووجد أن هذا التحلل السريع للبكتيريا يترتب عليه تكون بقع كبيرة الحجم وذات حواف مستوية ويعتبر تكون مثل هذه البقع هو الشكل المظهرى الذى تكونه الطفرات عند مهاجمتها للبكتيريا *E. coli* (شكل ١٨).

ولقد استخدم بنزر (Benzer) نوع معين من هذه الطفرات التى تسبب التحلل السريع للبكتيريا *E. coli* وسميت هذه الطفرات باسم rII mutants حيث يمكنها أن تنمو وتتكاثر تحت ظروف بيئية معينة ولا تنمو ولا تتكاثر تحت ظروف بيئية أخرى حيث وجد أن هذا القسم من الطفرات يمكنها أن تتكاثر داخل السلالة B ولكنها لا تستطيع أن تتكاثر داخل خلايا السلالة k_{12} من البكتيريا *E. coli*، ومثل هذا الاختلاف فى تكاثر هذه الطفرات rII mutants فى أى من السلالتين البكتيريتين B , k_{12} سمح لبنزر (Benzer) من مشاهدة وتحليل بعض الأحداث الوراثية نادرة الحدوث .



شكل (١٨) : يوضح الشكل المظهرى للبقع (Plaques) الناتجة من تحلل (lysis) البكتيريا بواسطة البكتريوفاج T_4 حيث تمثل البقع الصغيرة الشكل المظهرى الناتج من مهاجمة الطراز البرى من الفيرس (r^+) للبكتيريا بينما تمثل البقع الكبيرة الشكل المظهرى للطفرات (r).

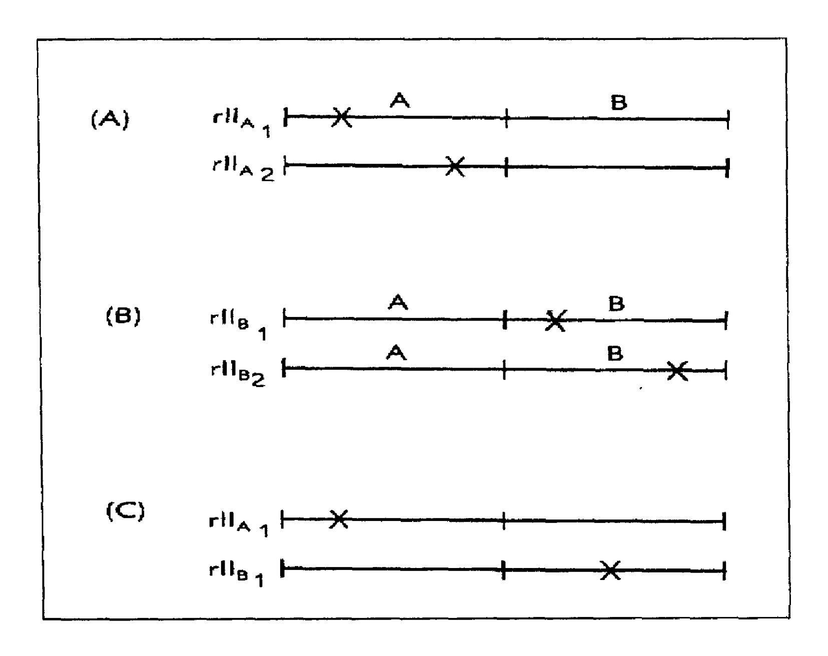
السسترون The cistron

استطاع بنزر (Benzer) عزل حوالى ٢٠٠٠ طفرة من هذه الطفرات (rII mutants) التى تحدث فى البكتريوفاج T_4^+ وتسبب التحلل السريع وكل هذه الطفرات لها نفس الشكل المظهرى من حيث تكونها لبقع (Plaques) كبيرة الحجم عند تكاثرها داخل السلالة B وعدم مقدرتها على التكاثر داخل خلايا السلالة k_{12} من البكتيريا *E . coli* . ولقد تساءل بنزر (Benzer) هل كل هذه الطفرات (rII mutants) تشمل نفس الوظيفة بمعنى أنها تقع فى نفس الچين وبالتالى تكون أليلات متعددة (Multiple alleles) بنفس الچين أو أنها تقع فى چينات مختلفة. وللإجابة على ذلك السؤال استخدم عدم مقدرة هذه الطفرات على التكاثر داخل خلايا السلالة k_{12} من البكتيريا *E. coli* وكذلك أستخدام اختبار التكامل. ولذلك قام بنزر (Benzer) بإجراء العدوى المختلطة (Mixed infection) باستخدام أى طفرتين من هذه الطفرات (rII mutant) والتى تسبب التحلل السريع فى عدوى خلايا السلالة البكتيرية k_{12} فى نفس الوقت. وأوضحت نتائج العدوى المختلطة لخلايا السلالة البكتيرية k_{12} أنه على الرغم من أن هذه الطفرات لا تستطيع التكاثر داخل الخلايا البكتيرية للسلالة k_{12} إلا أنه شاهد ولاحظ أن بعض التوافيق بين طفرتين ما من هذه الطفرات حدث التكامل بينها والذى أدى الى حدوث تحلل للخلايا البكتيرية من السلالة k_{12} وتكون بقع صغيرة الحجم تشبه البقع التى يكونها الطراز البرى من هذا البكتريوفاج (T_4^+).

وبعد اخضاع هذه الطفرات التى تحدث فى البكتريوفاج T_4^+ وتسبب التحلل السريع لإختبار التكامل وباستخدام السلالة البكتيرية k_{12} كعائل لتكاثر هذه الطفرات استطاع بنزر Benzer أن يقسم هذه الطفرات الى قسمين رئيسيين هما (شكل ١٩) :

١- طفرات القسم A (rII A mutants) وهى الطفرات التى لا يحدث التكامل بين أى طفرتين منهما عند استخدامهما فى العدوى المختلطة للسلالة k_{12} من البكتيريا *E. coli* ولكن يحدث تكامل بين أى طفره من طفرات هذا القسم وأى طفرة أخرى من طفرات القسم B.

٢- طفرات القسم B (rII B mutants) وهى أيضاً الطفرات التى لا يحدث التكامل بين أى طفرتين منهما عند استخدامهما فى العدوى المختلطة للسلالة k_{12} من البكتيريا *E. coli* ولكن يحدث التكامل بين أى طفرة من طفرات هذا القسم وأى طفرة أخرى من طفرات القسم A.



شكل(١٩): يوضح حدوث التكامل (Complementation) لطفرات التحلل السريع rII

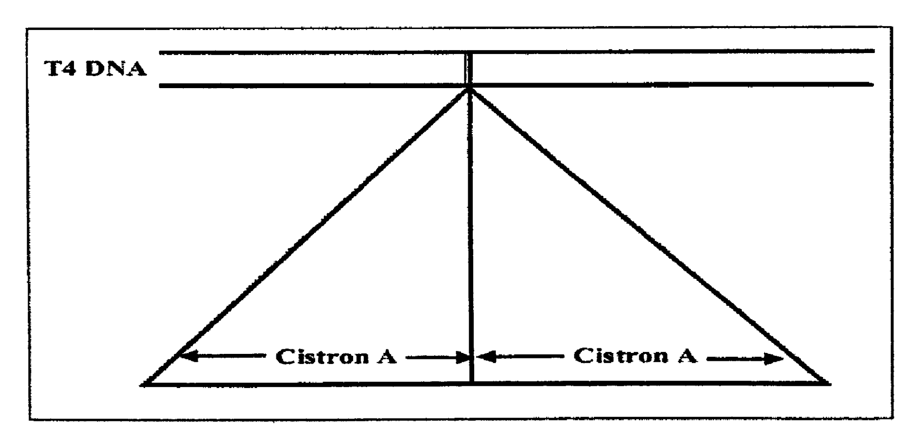
شرح شكل (١٩)

A- العدوى المختلطة لطفرتين من طفرات القسم A (rII A) للسلالة البكتيرية k_{12} من البكتيريا *E. coli* ولا يحدث تكامل لغياب الوظيفة الطبيعية للچين (السسترون) A.

B- العدوى المختلطة لطفرتين من طفرات القسم B (rII B) للسلالة البكتيرية k_{12} من البكتيريا *E. coli* ولا يحدث تكامل لغياب الوظيفة الطبيعية للچين (السسترون) B.

C- العدوى المختلطة لطفرة من القسم A ($rII\ A_1$) وطفرة من القسم B ($rII\ B_1$) للسلالة البكتيرية k_{12} من البكتريا *E. coli* وحدوث التكامل بين الطفرتين حيث أن الطفرة $rII\ A_1$ طبيعية بالنسبة للسسترون B والطفرة $rII\ B_1$ طبيعية بالنسبة للسسترون A.

ولقد استنتج بنزر (Benzer) من هذه التجارب التى أجراها أن المنطقة الوراثية أو الموقع الوراثى (Genetic locus) فى البكتريوفاچ T_4 (Bacteriophage) والمسؤلة عن حدوث تحلل (Lysis) الخلايا البكتيرية العائلة يمكن تقسيمها الى وحدتين وظيفيتين (Functional units) هما الوحدة الوظيفية A والوحدة الوظيفية B وعلى ذلك يمكن استنتاج أن الشكل المظهرى لصفة تحلل الخلايا البكتيرية العائلة بواسطة البكتريوفاچ T_4 يتحكم فيها وحدتين وظيفتين (شكل ٢٠).



شكل (٢٠): يوضح الموقع الجينى (Genetic locus) فى البكتريوفاچ T_4 الذى يتحكم فى صفة التحلل المظهرية (Lysis phynotype) والذى يتركب من وحدتين وظيفتين أو سسترونين هما :

– سسترون A (Cistron A) والذى لا يحدث تكامل بين الطفرات التى تحدث به .

– سسترون B (Cistron B) والذى لا يحدث تكامل بين الطفرات التى تحدث به أيضاً ولكن يحدث تكامل بين أى طفرة فى السسترون A وأى طفرة أخرى فى السسترون B .

ولقد ابتكر بنزر (Benzer) اصطلاح سسترون (Cistron) ليشير الى وحدة الوظيفة (Functional unit) بدلاً من استخدام اصطلاح چين (Gene) وخاصة فى الصفات أو الشكل المظهرى (Phenotype) المحدد الذى يتحكم فيه أكثر من وحدة وظيفية وأن هذه الوحدة الوظيفية السسترون (Cistron) لا يحدث تكامل بين الطفرات التى تحدث فيها ومع ذلك فإن اصطلاح سسترون (Cistron) يعادل اصطلاح الچين (Gene) والذى هو عبارة عن

تلك الكمية من الـــDNA التى تؤدى وظيفة واحدة. وفى هذه الأيـــام يـــستخدم اصـــطلاح چـــين (Gene) بصورة أكثر شيوعاً عن اصطلاح سسترون (Cistron) وإن كان كلاهما يشير الى نفس الكينونة (Entity) . ومن المفضل والمنطقى استخدام اصطلاح ســسترون (Cistron) فـــى حالـــة الچينات التى تشترك فى إنتاج صفة مظهرية محددة أو فى حالة الچينات التى تشترك فـــى إنتـــاج بروتينات خلوية تتركب من أكثر من نوع من السلاسل عديدة الببتيد سواء كانت هذه البروتينـــات هى بروتينات تركيبية أو بروتينات وظيفية مثل الإنزيمات.

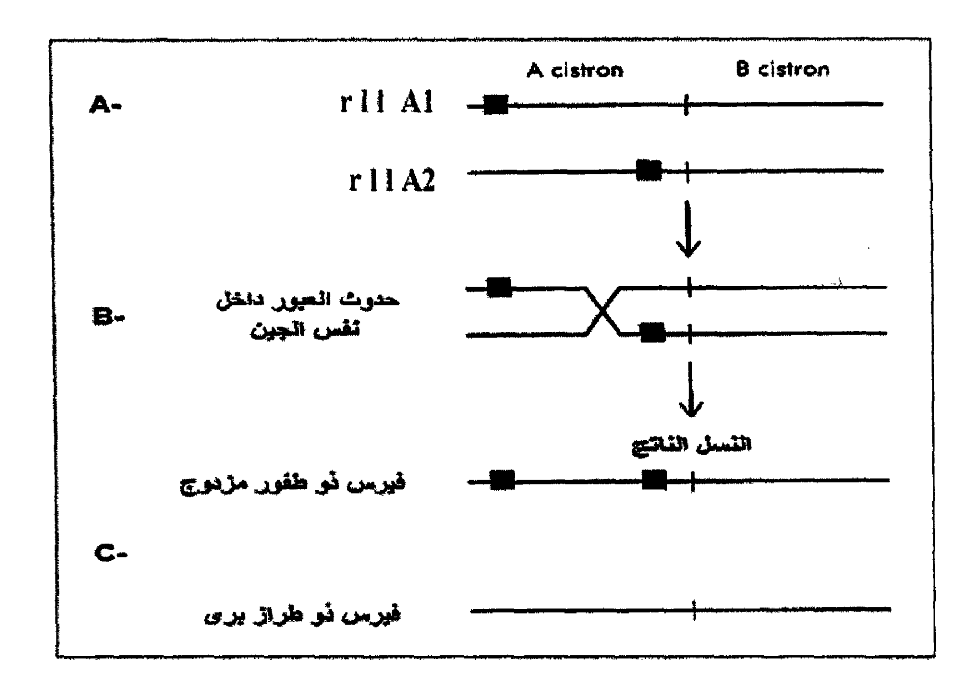
الريكون The Recon

وجد بنزر Benzer أنه عند استخدام العدوى المختلطة لأى طفرتين من طفرات القسم A (rII A mutants) بأعداد كبيرة فى عدوى السلالة البكتيرية B من البكتيريا *E. coli* وكذلك أيضاً عند استخدام العدوى المختلطة لأى طفرتين من طفرات القسم B (rII B mutants) بأعداد كبيرة فى عدوى السلالة B من البكتيريا *E. coli* أنه بالإضافة الى تكوين البقع الكبيرة ذات الحواف المستوية وهى البقع التى يحدثها الطراز الطفرى من هذه الطفرات لاحظ أيضاً تكون بقع صغيرة ذات حواف متعرجة تشبه البقع (Plaques) التى يحدثها الطراز البرى من هذا البكتريوفاچ (T_4^+). لاحظ بنزر (Benzer) أيضاً أن معدل تكون البقع الصغيرة ذات الطراز البرى معدل مرتفع لا يمكن أن يرجع الى حدوث أرتداد أى من الطفرتين الى الطراز البرى. والأكثر من ذلك أنه عندما قام بأخذ ڤيروسات من تلك الموجودة فى هذه البقع الصغيرة وأجرى بها عدوى السلالة B من البكتيريا *E. coli* وجد أن هذه الڤيروسات تكون بقع صغيرة مطابقة تماماً لتلك البقع التى يكون الطراز البرى من البكتريوفاچ T_4^+ وبذلك استنتج بنزر Benzer أن هذه الڤيروسات ذات الطراز البرى ناتجة عن حدوث العبور (Crossing over) بين الطفرتين الموجودتين فى نفس الوحدة الوظيفية (السسترون) ولا يمكن أن تعزى الى حدوث الارتداد العكسى لأى من الطفرتين الى الطراز البرى حيث يؤدى حدوث العبور بين الطفرتين الى تكوين جزيئات ڤيرسيه ذات طراز برى (Wild type virus) (شكل ٢١). وتؤكد هذه النتائج على حدوث العبور داخل نفس الوحدة الوظيفية (نفس الچين أو نفس السسترون) والذى يعرف باسم العبور داخل نفس الچين (Intragenic crossing over) تمييزاً له عن العبور الذى يحدث بين الچينات (Intergenic crossing-over).

ولقد استطاع بنزر (Benzer) من استخدام طفرات نفس القسم سواء طفرات القسم A أو القسم B وإجراء العدوى المختلطة بأى طفرتين من أى منها للسلالة B من البكتيريا *E. coli* لتقدير المسافة الخريطية (Map distance) بين أى طفرتين من نفس القسم ووجد أن أصغر مسافة يمكن أن يحدث فيها العبور (Crossing over) تعادل أو تناظر تلك المسافة تقريباً بين اثنين من أزواج القواعد داخل نفس الچين. وبذلك استنتج بنزر Benzer أن حدوث العبور (Crossing over) وتكوين تراكيب وراثية جديدة يمكن أن يحدث فى بعض الحالات بين أزواج القواعد فى نفس الچين أو نفس السسترون. ولذلك ابتكر بنزر (Benzer) استخدام اصطلاح ريكون (Recon) ليشير الى أصغر وحده من الچين يحدث بينها العبور وتكوين تراكيب وراثية جديدة وهذه المسافة تعادل المسافة بين زوجين من القواعد المتجاورة فى نفس الچين عند ادنى مستوى لها.

الميتون The Muton

نظراً لأن أصغر مسافة داخل نفس الچين (نفس السسترون) يمكن يحدث فيها العبور تعادل المسافة بين زوجين من القواعد المتجاورة فى نفس الچين وذلك على طول الچين تنبأ بنزر (Benzer) بأن أدنى مستوى من الچين (السسترون) يمكن أن تحدث به الطفرة يمثل حدوث الطفرة فى زوج من القواعد ومنذ ذلك الوقت أوضحت الأدلة التجريبية الأضافية حدوث الطفرة عند مستوى زوج من القواعد داخل نفس الچين (نفس السسترون) ومن بين هذه الأدلة تلك التى جاءت من تحليل هيموجلوبين الدم الطبيعى والهيموجلوبين الطافر حيث وجد أن الأختلاف بينهما يرجع الى إحلال الحامض الأمينى الڤالين (Valine) فى الهيموجلوبين الطافر بالحامض الأمينى جلوتاميك (Glutamic) فى الهيموجلوبين الطبيعى وأن الشفرة الوراثية Genetic code للحامض الأمينى الجلوماتيك هى (GAG) بينما الشفرة الوراثية للحامض الأمينى الڤالين هى (GTG) ويتضح من ذلك أن التغير فى الشفرة كان عند مستوى زوج من القواعد حيث حدث إحلال للقاعدة ثيمين (T) Thymine محل القاعدة أدينين (A) Adenine. وعلى ذلك ابتكر بنزر Benzer اصطلاح ميتون (Muton) ليشير الى أصغر وحدة طفور داخل نفس الچين أو نفس السسترون وهى تعادل زوج واحد من القواعد على طول الچين أو طول السسترون عند أدنى مستوى للطفور.



شكل (٢١): يوضح حدوث العبور داخل نفس السسترون أو داخل نفس الچين
(Intragenic crossing-over)

A- حدوث العدوى لطفرتين من القسم rIIA للسلالة البكتيرية B من البكتيريا *E. coli* .

B- حدوث العبور بين الطفرتين من القسم rIIA فى نفس السسترون (Cistron A) .

C- ينتج عن هذا العبور طرازين من النسل الڤيرسى أحدهما ذو طفور مزدوج والذى لا يستطيع مهاجمة السلالة k_{12} من البكتيريا *E. coli* والطراز الآخر ڤيرس طبيعى يمكنه أن يهاجم السلالة k_{12} من البكتيريا k_{12} وينتج بقع (Plaques) صغيرة.

التعريف الدقيق للچين Fine definition of a gene

من نتائج هذه الأبحاث والدراسات السابقة يمكن أن نضيف الى معلوماتنا تعريف أكثر دقة للچين وهو أن الچين عبارة عن منطقة كروموسومية محددة ومسئول عن وظيفة خلوية واحدة ويتركب الچين من تتابع طويل من النيوكليوتيدات يتضمن مواقع طفرية (Mutable sites) والتى يمكن أن يحدث بينها العبور لتكوين تراكيب وراثية جديدة.

تركيب الچين في الكائنات حقيقية النواة Structure of Eukaryotic Gene

يمكن إجراء اختبار التكامل بكل سهولة في الكائنات الدقيقة وذلك لوجود أعداد كبيرة من النسل و الذي يمكننا من تحديد و تعيين الاختلافات الوراثية النادرة ولكن ليس من السهل إجراء هذا الاختبار في الكائنات حقيقية النواة وذلك لصعوبة الحصول علي نسل كبير وكذلك صعوبة فحص هذا النسل ومع ذلك يوجد مثاليين في الكائنات حقيقية النواة أمكن تطبيق هذا الاختبار عليهما.

١. الموقع الچيني الذي يتحكم في لون العين الوردي (Rosy locus) في حشرة الدروسوفيلا. فعندما اجري اختبار التكامل علي طفرات هذا الموقع الچيني أوضحت النتائج أن هذا الموقع الوراثي يتركب من وحدتين تكامليتين او وحدتين وظيفيتين وعلي ذلك فإن هذا الموقع الچيني الذي يتحكم في صفة مظهرية واحدة وهي لون العين في الدروسوفيلا يتركب من سسترونين (Cistrons) .

٢. الموقع الچيني الذي يتحكم في شكل الاندوسبرم الشمعي (Waxy locus) في حبوب الذرة وبإجراء اختبار التكامل بين طفرات هذا الموقع الوراثي وجد أنه يتركب من ستة وحدات تكاملية أو ستة وحدات وظيفية أو ستة سسترونات وعلى ذلك يتضح أن تعريف الچين على أساس اختبار التكامل قابل للتطبيق أيضاً فى الكائنات حقيقة النواة.

ومع ذلك فإن چينات الكائنات حقيقية النواة تتميز بمظهر تركيبى فريد والذى لا يتواجد فى الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) حيث اكتشف فى نهاية السبعينات من القرن العشرين أن عديد من چينات الكائنات حقيقية النواة تحتوى على طرازين من التتابعات النيوكليوتيديه هما:

١- التتابع النيوكليوتيدى الشفرى أو الإكزون (Coding Sequence or Exon) وهو ذلك التتابع النيوكليوتيدى الموجود بالچين والذى ينسخ ويترجم فى النهاية الى أحماض أمينية فى البروتين الناتج من نسخ وترجمة الچين.

٢- التتابع النيوكليوتيدى غير الشفرى أو الإنترون(Non coding sequence or Intron) وهو ذلك التتابع النيوكليوتيدى الموجود بالچين والذى ينسخ ولا يترجم الى أحماض أمينية فى البروتين الناتج من نسخ وترجمة الچين.

ويحتوى الچين الواحد على عديد من الإكزونات وعديد من الإنترونات التى تتواجد فى صورة متبادلة مع الإكزونات على طول الچين. ووجود الإنترونات يكون محدداً بچينات الكائنات حقيقية النواة باستثناء عدد قليل من الچينات الڤيرسية فى بعض الڤيروسات مثل الادينوڤيرس (Adenovirus) والذى يتكاثر فقط فى نواة خلايا الكائنات حقيقية النواة. وفى الكائنات حقيقية النواة فإن كل چيناتها تحتوى على الإنترونات بالاضافة الى الإكزونات باستثناء الچينات التى تنتج بروتين الهستون والچينات التى تنتج الإنترفيرونات (Interferons) وهى بروتينات مضادة للنشاط الڤيرسى. ويتراوح عدد الإنترونات الموجودة بچينات الكائنات حقيقية النواة من عدد قليل الى عدد كبير من الإنترونات فى الچين الواحد ومن أمثلة ذلك ما يلى:

١. چين الألفاجلوبين (α globin gene) يحتوى على إنترونين وثلاثة إكزونات.

٢. چين اوڤالبيومين (Ovalbumin gene) فى الدجاج يحتوى على سبعة إنترونات وثمانية إكزونات.

٣. چين ألفاكولاچين (Alpha-collagen gene) يحتوى على خمسون إنترون وإحدى وخمسون إكزون.

ويجب ملاحظة أن الچين يبدأ دائماً بإكزون وينتهى بإكزون آخر. ووجود الإنترونات فى چينات الكائنات حقيقية النواة يبدو أنه يمثل إنتهاك بين طول الچين أو طول المنسخ الأولى الناتج من نسخ هذا الچين Hetrogenous nuclear RNA (hnRNA) وطول السلسلة عديدة الببتيد (Polypeptide chain) الناتجة من نسخ وترجمة چين ما حيث يكون المنسخ الأولى (hnRNA) أكبر بكثير من طول السلسلة عديدة الببتيد الناتجة من نسخ وترجمة ذلك الچين وبالرغم من ذلك فسوف نظل ننظر للچين (Gene) أو السسترون (Cistron) على أنه ذلك التتابع النيوكليوتيدى من الـــDNA والمسئول عن تخليق نوع واحد من السلاسل عديدة الببتيد وأن هذا التتابع النيوكليوتيدى يحتوى على مواقع طفرية والتى يحدث بينها العبور داخل نفس الچين أو نفس السسترون لتكوين تراكيب وراثية جديدة وأن وجود الإنترونات فى چينات الكائنات حقيقية النواة لا يغير مفهومنا عن التركيب الدقيق للچين. ويرجع اكتشاف احتواء چينات الكائنات حقيقية النواة على كل من الإكزونات والإنترونات الى اكتشاف كل من:

١- المنسخ الاولى (Primary transcript) أو ما يعرف باسم الـــhnRN هو ذلك المنسخ الأولى الناتج من نسخ الچين بما يحتويه من الإكزونات والإنترونات والذى يتحول داخل النواة (Nucleus) وقبل ذهابه الى السيتوبلازم الى جزىء mRNA الناضج والذى تتم ترجمته الى البروتين المناسب داخل السيتوبلازم.

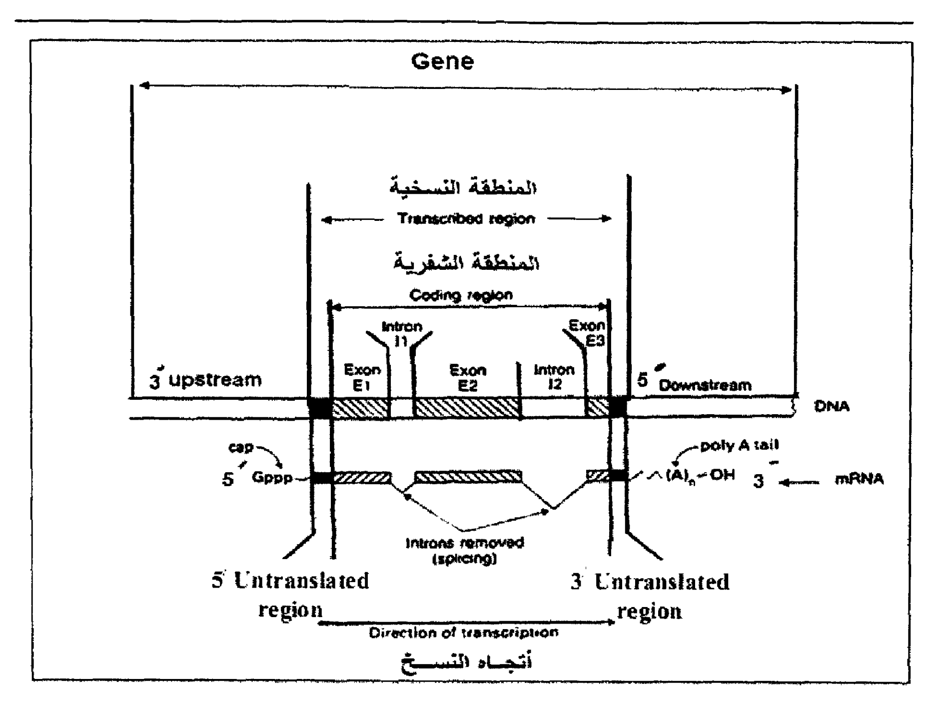
٢- عملية وصل الـــRNA (RNA splicing process) وتتلخص هذه العملية فى إزالة الإنترونات من الـــhnRNA وتجميع الإكزونات وتكوين جزيء الـــmRNA الناضج والفعال وظيفياً داخل النواة وذلك بمساعدة الإنزيمات الخلوية اللازمة لذلك حيث تتم هذه العملية بكل دقة ويترتب على ذلك تكوين جزيئى الـــmRNA الناضج الذى يترك النواة ويذهب الى السيتوبلازم لترجمته الى البروتين المناسب.

التصميم العام للجينات التى تحمل شفرات البروتين فى الكائنات حقيقية النواة
General plan of a protein coding gene in eukaryotes

تتركب الچينات التى تنسخ (Transcription) وتترجم (Translation) الى الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية فى الكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes) والتى يقوم بنسخها إنزيم البلمرة الـــRNA polymerase II من ثلاثة مكونات رئيسية (شكل ٢٢) وهى:

١- منطقة البروموتور (Promoter region) أو منطقة شمال بداية الچين (3′ Upstream region) وتتحكم هذه المنطقة فى ابتداء نسخ الچين وذلك عن طريق ارتباط إنزيم بلمرة الـــRNA بها ليبدأ نسخ الچين وتضم هذه المنطقة عديد من العناصر التى تتحكم فى نسخ الچين منها العناصر اللازمة لحدوث أعلى معدل من نسخ الچين مثل المعززات (Enhancers) والعناصر اللازمة لتنظيم التعبير الچينى للچين وذلك إما بالأستجابة لمنبه بيئى أو الاستجابة لبرنامج النمو.وكل هذه العناصر تمثل تتابعات من النيوكليوتيدات والتى يكون بعضها ذو تتابع فريد (Unique) بالنسبة لبعض الچينات. وبصفة عامة تعرف التتابعات النيوكليوتيديه الموجودة فى هذه المنطقة بالصندوق (TATA box) أو الصندوق (CCAAT box) حيث وجدت هذه التتابعات فى عديد من چينات الكائنات حقيقية النواة التى تنتج البروتينات الخلوية.

٢- منطقة انتهاء النسخ (Termination region) أو المنطقة يمين انتهاء نسخ الچين (5′ Downstream region) وتقع هذه المنطقة فى الطرف 5′ من الچين (شكل ٢٢) وتحتوى على العناصر اللازمة لإنهاء نسخ الچين والتى غالباً ما تتركب من تتابعات نيوكليوتيديه فريدة حيث يتوقف إنزيم البلمرة الـــRNA polymerase II من الاستمرار فى النسخ عندما يصل الى هذه المنطقة من الچين، كما تحتوى على المعلومات اللازمة لتكوين الذيل (Tail) والذى يتركب من عديد من نيوكليوتيدات الأدينين (Poly A Tail) والذى يضاف على المنسخ الأولى (hnRNA) بعد نسخه ويتراوح طول هذه الذيل ما بين ٥٠ الى ٢٠٠ نيوكليوتيدة.



شكل (٢٢): يوضح التصميم العام لچين ما يحمل شفرات البروتين فى الكائنات حقيقية النواة
General plan of a protein coding gene in Eukaryotes

٣- المنطقة النسخية (Transcribed region): يبدأ نسخ الچين بواسطة إنزيم البلمرة RNA polymerase II من عند شفرة البداية (Initiation codon) والتى توجد فى بداية هذه المنطقة النسخية ويستمر الإنزيم فى نسخ الچين وتكوين المنسخ الأولى (hnRNA) ويتوقف عن الاستمرار فى نسخ الچين عندما يصل الإنزيم الى ذلك التتابع النيوكليوتيدى الذى يحدد انتهاء نسخ الچين وتتركب هذه المنطقة من ثلاثة مكونات (شكل ٢٢) هى:

أ- المنطقة التى لا تترجم فى الطرف $3'$ وتسمى باسم $5'$ Untranslated region ($5'$UTR) وهى المنطقة من الچين التى تنسخ ولا تترجم وتقع فى الطرف $5'$ من المنطقة النسخية وتحتوى على تتابع نيوكليوتيدى يختلف طوله باختلاف الچينات حيث تتراوح طولها ما بين٣٥ نيوكليوتيدة الى ٦٧٠ نيوكليوتيدة وتلعب دوراً فى تنظيم التعبير الچينى ما بعد النسخ.

ب- المنطقة التى لا تترجم فى الطرف $3'$ وتسمى باسم $3'$ Untranslated region ($3'$UTR) وتقع فى الطرف $3'$ من المنطقة النسخية وملاصقة لآخر إكزون (Exon) فى الچين ويتراوح طولها ما بين ٥٠ الى ٢٠٠ نيوكليوتيدة فى بعض الچينات وتؤثر هذه المنطقة فى عملية الترجمة وثبات جزىء الـ mRNA الناضج.

ج- المنطقة الشفرية (Coding region) وتقع بين المنطقتين السابقتين وتحتوى على طرازين من التتابعات النيوكليوتيديه هما التتابعات النيوكليوتيديه الشفرية (Coding sequences) أو الإكزونات (Exons) وهى تلك التتابعات النيوكيوتيدية التى تنسخ وتترجم الى الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج من نسخ الچين وترجمته والتتابعات النيوكليوتيديه غير الشفرية (Noncoding sequences) أو الإنترونات (Introns) وهى تلك التتابعات النيوكليوتيديه من الچين التى تنسخ ولا تترجم الى أحماض أمينية فى البروتين الناتج من نسخ وترجمة الچين. ويتواجد كل من الإكزونات والإنترونات فى صورة متبادلة داخل المنطقة النسخية ولابد أن تبدأ المنطقة النسخية من الچين بإكزون وتنتهى بإكزون آخر. ويقوم إنزيم البلمرة الـ RNA polymerase II بنسخ كل من الإكزونات والإنترونات الموجودة فى المنطقة النسخية من الچين وبالتالى يتكون المنسخ الأولى (hnRNA) والذى يمثل الغالبية العظمى من الـ RNA الموجود بالنواة الذى تحدث منه إزالة للإنترونات وتجميع الإكزونات معاً بواسطة عمليات إنزيمية معقدة تتم بكل دقة لتكوين جزىء الـ mRNA الناضج الذى يترك النواة ويذهب الى السيتوبلازم من خلال الثقوب الموجودة فى الغلاف النووى لترجمته فى السيتوبلازم الى البروتين المناسب.

طرز الچينات Types of Genes

تنقسم الچينات التى يتم نسخها بواسطة إنزيمات بلمرة الـ RNA (RNA polymerases) فى كل من الكائنات غير حقيقية النواة والكائنات حقيقية النواة الى قسمين رئيسين هما:

١- الچينات التى تنسخ وتترجم الى الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية.

٢- الچينات التى تنسخ فقط ولا تترجم الى بروتينات خلوية وهى تلك الچينات التى تنسخ الى أنواع أخرى من الـ RNA الخلوية مثل الـ tRNA والـ rRNA والأنواع الصغيرة من

الـــRNA السيتوبلازمى (scRNA) وكذلك الأنواع الصغيرة من الـــRNA النووى (snRNA) وسوف نتعرض فيما بعد بالتفصيل للطبيعة الكيمائية لنسخ الچينات.

أولاً: نسخ طرز الچينات المختلفة فى الكائنات غير حقيقية النواة
Transcription of different types of Prokaryotic genes

فى الكائنات غير حقيقية النواة مثل البكتيريا يقوم إنزيم البلمرة البكتيرى بنسخ كلا طرازين الچينات السابقة ونظراً لأهمية هذا الإنزيم فى نسخ كل الچينات البكتيرية فسوف نتناول تركيب هذا الإنزيم بالتفصيل حيث يتركب إنزيم بلمرة الـــRNA البكتيرى (RNA polymerase) من خمسة وحدات بروتينية هى:

١- سلسلتين عديدة الببتيد ألفا (α) وزن كل منها الجزيئى ٤٠٠٠٠ دالتون.

٢- سلسلة عديدة الببتيد بيتا (β) وزنها الجزيئى ١٥٠٠٠٠ دالتون.

٣- سلسلة عديدة الببتيد بيتا داش ($\beta^\backslash$) وزنها الجزيئى ١٦٥٠٠٠ دالتون.

٤- سلسلة عديدة الببتيد سجما (δ) وزنها الجزيئى ٩٥٠٠٠ دالتون.

وعلى ذلك يصبح الوزن الجزيئى الكلى للإنزيم الكامل ($\alpha^2\beta^\backslash\beta\delta$) Holoenzyme هو ٤٩٠٠٠٠ دالتون ويعرف الجزء من الإنزيم الذى يتركب من $\alpha^2\beta^\backslash\beta$ باسم الإنزيم المركزى (Core enzyme). وتقوم السلسلة عديدة الببتيد سجما (δ) من الإنزيم فى التعرف على البداية الصحيحة لنسخ الچين وهى منطقة البروموتور (Promoter) من الچين ثم تنفصل عن الإنزيم الكامل فور التعرف على منطقة البرموتور وبداية نسخ الچين بينما يستمر الإنزيم المركزى (Core enzyme) ويستمر فى نسخ الچين من خلال ثلاثة مراحل أساسية سوف نتناولها بالتفصيل فى الباب الثالث ونظراً لوجود نوع واحد من إنزيمات بلمرة الـــRNA فى البكتيريا فإن الوحدة البروتينية سجما (δ) من هذا الإنزيم يمكنها أن تتغير فى التركيب لتواجه متطلبات نسخ طرز الچينات المختلفة بينما يظل باقى مكونات الإنزيم ثابتة التركيب.

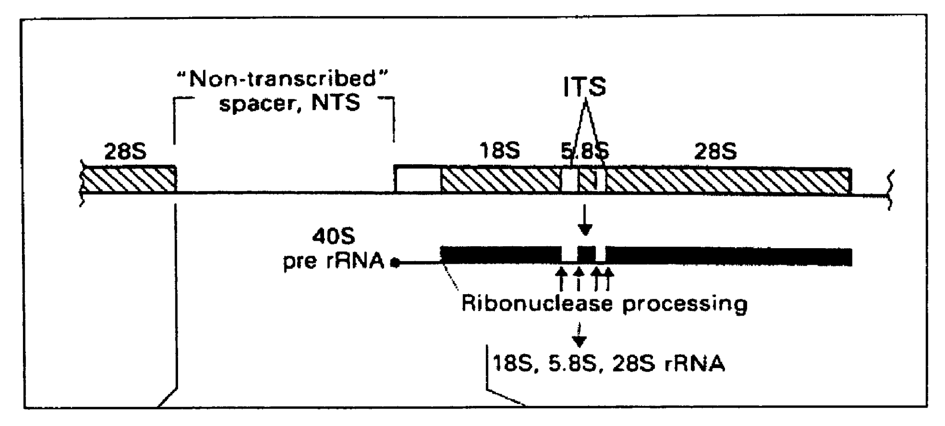
ثانياً: نسخ طرز الچينات المختلفة فى الكائنات حقيقية النواة
Transcription Of Different Types Of Eukaryotic Genes

فى الكائنات حقيقية النواة يتم نسخ طرز الچينات المختلفة بواسطة ثلاثة أنواع مختلفة من إنزيمات بلمرة الـ RNA وهى:

أولاً: إنزيم البلمرة RNA Polymerase I (Pol I)

ويقوم هذا الإنزيم بنسخ الچينات التى تنتج الأنواع المختلفة من الأحماض النووية الريبوسومية Ribosomal RNA (rRNA) المختلفة وهى 5.8SrRNA , 18SrRNA , 28SrRNA حيث يتم نسخ هذه الأنواع الثلاثة من الـRNA المختلفة من على الچينات فى صورة منسخ أولى Pre-rRNA (شكل٢٣) وتسمى الوحدة النسخية من الـ DNA التى تنسخ الى الأنواع الثلاثة السابقة من الـrRNA بالوحدة النسخية (Transcriptional unit) وتضم هذه الوحدة النسخية مسافة من الـDNA تفصل بين كل من 5.8S ,18S , 28S وتعرف هذه المناطق من الـDNA باسم الـDNA الداخلى الذى ينسخ Internal transcribed spacer (ITS) وتنفصل كل وحدة نسخية عن الأخرى بوجود مسافة من الـDNA لا تنسخ Non transcribed spacer (NTS) وتتم ازالة الـ ITS من المنسخ الأولى pre-rRNA بواسطة ازيمات الـ (Endonucleases) لتكوين الأنواع الثلاثة من الأحماض النووية الريبوسومية المختلفة وهى 5.8SrRNA ,18SrRNA , 28SrRNA. وتتكرر الچينات التى تنسخ الى الأنواع المختلفة من الـ rRNA فى معظم الكائنات حقيقية النواة بصورة متتالية (Tandem repeats) فى موقع أو أكثر من الچينوم.

ويحدث التعبير الچينى لهذه الچينات أو تنسخ هذه الچينات المتكررة بطريقة مثيرة أثناء عملية تكوين البويضات (Oogenesis) وكذلك فى مرحلة النمو الچنينى (Embryogenesis) لتقابل متطلبات تكوين الريبوسومات (Ribosomes) فى خلايا معينة والأكثرمن ذلك أنه يحدث فى الضفدع الأفريقى *Xenopus laevis* تضخيم (Amplification) لهذه الچينات (rDNA) الى آلاف المرات فى خلية البيضة الأولية (Oocyte) لإنتاج قطع من الـDNA غير الكروموسومية تحمل هذه الچينات (rDNA) الإضافية والتى يتم نسخها بصورة فعالة أثناء تكوين البويضات ثم يحدث لها إزالة بعد ذلك أو فقد أثناء الانقسام الميوزى.



شكل (٢٣): تنظيم الـــجينات التى تنسخ الى الأنواع المختلفة من الأحماض النووية الريبوسومية rRNA genes فى الضفدع الافريقى *Xenopus laevis*

ثانياً: إنزيم البلمرة RNA Polymerase II (pol II)

ويقوم هذا الإنزيم بنسخ طرازين من الجينات هما:

١- الجينات التى تنسخ وتترجم الى الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية حيث يقوم هذا الإنـــزيم بنسخ هذه الجينات وتكوين جزيء الـــhnRNA والذى يتحول الى mRNA ليترجم الى البروتين المناسب كما سبق شرحه.

٢- الجينات التى تنسخ الى أنواع أخرى من الـــRNA الـــصغيرة النوويـــة Small nuclear RNA (snRNA). وتوجد هذه الجينات فى صورة عـــائلات جينيـــة متعـــدده (Multigene families) تحتوى ما بين عشرة الى مائة نسخة (Copies) من كل جين. وهذه الجينات تنسخ بواسطة هـــذا الإنزيم (pol II) الى أنواع من الـــRNA الصغيرة النووية (snRNA) تحتوى ما بـــين ٩٠ الـــى ٤٠٠ نيوكليوتيدة وتتميز بدرجة عالية من الثبات كما أنها ترتبط ببعض البروتينات ووظيفة هـــذه الأنواع من الـــsnRNA أنها تشترك فى عملية تكوين جـــزيء الـــــmRNA الناضـــج بإزالـــة الإنترونات من المنسخ الأولى (hnRNA) كمـــا أنهـــا لهـــا دور فـــى عمليـــة تكـــوين الـــذيل (Poly A tail) لجزيئات الـــmRNA.

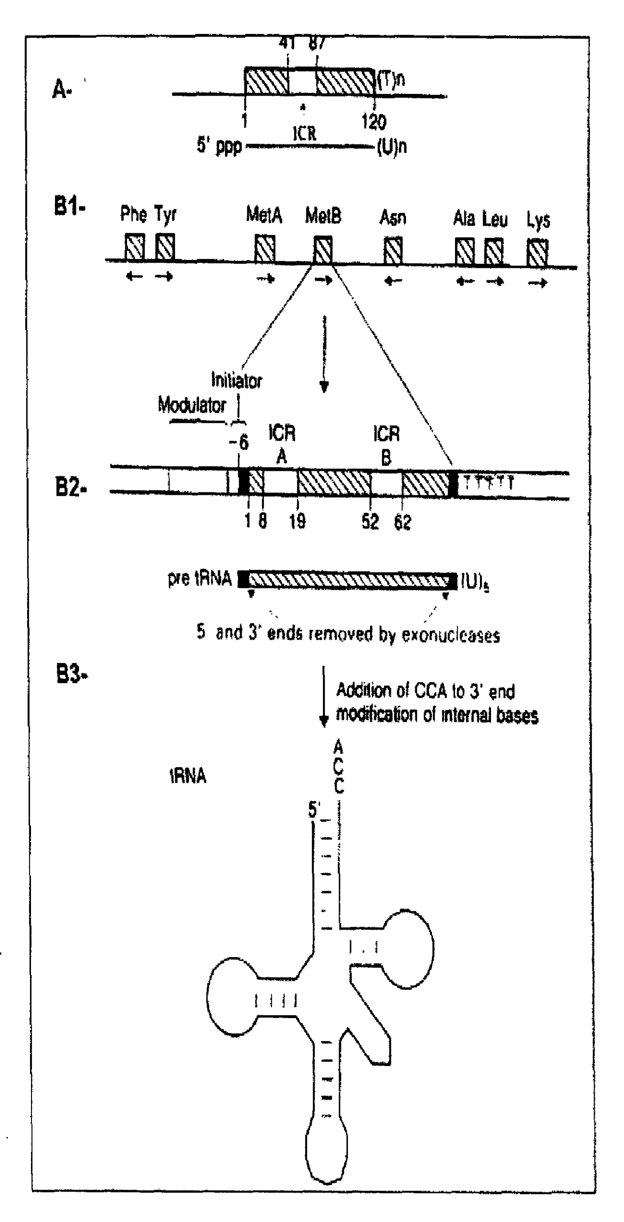
ثالثاً: إنزيم البلمرة (RNA Polymerase III (pol III

ويقوم هذا الإنزيم (pol III) بنسخ عدد من طراز الجينات المختلفة الصغيرة وهي:

١- **جينات الـ 5SRNA genes** : درست هذه الجينات دراسة مستفيضة فى الضفدع الأفريقى *Xenopus laevis* ووجد أن الجين الواحد منها (5S gene) يتكرر حتى يصل الى حوالى ٢٠٠٠٠ نسخة من الجين موزعة فى ثلاثة عائلات جينية متعددة .العائلة الأولى منها تضم ٤٠٠ نسخة من الجين 5SRNA gene ويظهر التعبير الجينى لجينات هذه العائلة فى خلية البيضة الأولية (Oocyte) وفى الخلايا الجسمية فى كل الأوقات ويسمى هذا الطراز من الجينات باسم Somatic type 5SRNA genes. والعائلة الثانية والثالثة تضم باقى جينات الـ 5SRNA gene والتى يظهر التعبير الجينى لها أثناء تكوين خلايا البويضات الأولية (Oocytes) بينما تكون ساكنة فى الخلايا الجسمية ويسمى هذا الطراز من الجينات باسم Oocyte-type 5SRNA genes ويتراوح طول كل چين من جينات الـ 5SRNA gene حوالى ١٢٠ نيوكليوتيدة.

ويحدث تنظيم التعبير الجينى لكل چين من هذه الجينات عن طريق بروموتور (Promoter) داخل المنطقة النسخية (Internal control region (ICR عن طريق تفاعل هذا البروموتور مع عديد من طرز البروتينات الخلوية (شكل ٢٤).

٢- **جينات الـ tRNA genes** : هذا الطراز من الجينات هى التى تنسخ الى الأنواع المختلفة من الأحماض النووية الناقلة (tRNA) والتى يبلغ طولها ٨٠ نيوكليوتيدة . وتوجد هذه الجينات فى الضفدع الأفريقى *Xenopus laevis* فى صورة متجمعة فى منطقة تحتوى على ٣١٠٠ نيوكليوتيدة فى الطول ويحدث نسخ لعديد من هذه الجينات فى صورة Polycistronic tRNA والذى يتجزأ بعد ذلك الى أنواع مختلفة من الـ tRNA. وتحتوى جينات الـ tRNA genes أيضاً على مناطق تحكم داخلى (Intragenic control regions (ICR ولكنها مجزئه فى منطقتين A , B وتؤثر المسافة بينهما على كفاءة عملية النسخ وللمنطقة A دور فى تحديد بداية نسخ الـRNA ويرتبط بكلا المنطقتين A , B عوامل نسخ معينة. والتتابع النيوكليوتيدى الذى يسبق بداية الچين الذى ينسخ يقوم بتعزيز أو انخفاض معدل نسخ الچين ويسمى هذا التتابع النيوكليوتيدى باسم Modulator sequence (شكل ٢٤).



شكل (٢٤) يوضح ما يلى:

A-الچين 5SRNAgene واحتوائه على منطقة التحكم الداخلى (1CR).

B1- بعض چينات الأحماض النووية الناقلة المتجمعة فى جزء من الچينوم (DNA) والتى تنسخ الى الأحماض النووية الناقلة للأحماض الأمينيةالفينايل ألانين (Phe) والتيروسين (Tyr) والميثونين (Met A) و(MetB) والألانين (Ala) والليوسين (Leu) والليسين (Lys).

B2- تركيب چين الحامض النووى الناقل للميثيونين met B والذى يضم منطقة التحكم الداخلى (1CR) وهى A و B ومنطقة الـ Modulator ونسخه وتكوين المنسخ الأولى . Pre-tRNA.

B3- إزالة الأطراف $3'$ و$5'$ من المنسخ الأولى pre-tRNA بواسطة إنزيمات الـExonucleases وإضافة CCA الى الطرف $3'$ وتكوين الحامض النووى الناقل tRNA الذى يشبه ورقة البرسيم (Clover leaf).

٣- چينات الـ(scRNA) : Small Cytoplasmic RNA Genes

يوجد عديد من أقسام هذا النوع من الچينات (scRNA genes) لبعضها وظيفة أساسية بالخلية ومن بين هذه الأقسام الچينات المسماه 7SLRNA genes والتى تنتج الغالبية العظمى من الـRNA السيتوبلازمى والتى تدخل فى بناء مركب الريبونيوكليوبروتين (Ribonucleoprotein) والذى يعتبر مركب حاسم فى عملية إفراز البروتين. وفى الكائنات حقيقية النواة مثل الثدييات والدروسوفيلا والضفدع تحتوى الخلايا على أربعة چينات من هذا الطراز (7SLRNA genes) والفعالة وظيفياً وأن التتابع النيوكليوتيدى لهذه الچينات الأربعة ثابت فى الكائنات حقيقية النواة المختلفة.

التركيب العام لإنزيمات بلمرة الـ RNA فى الكائنات حقيقية النواة
General Structure Of Eukaryotic RNA Polymerases

أوضح العالمين William Ruller , Robert Roeder عام ١٩٦٩ وجود ثلاثة أنواع من إنزيمات بلمرة الـRNA فى الكائنات حقيقية النواة سابقة الذكر. وتتشابه هذه الإنزيمات الثلاثة فى التركيب الى درجة كبيرة حيث يتركب كل إنزيم منها من عشرة وحدات بروتينية معقدة كما تتشابه هذه الإنزيمات الثلاثة فى احتوائها على الوحدات البروتينية β و β' والتى تشابهان الوحدات البروتينية β و β' الموجودة فى إنزيم البلمرة البكتيرى، بينما باقى الوحدات البروتينية هى وحدات صغيرة فى التركيب بعضها متشابه فى التركيب فى الإنزيمات الثلاثة وبعضها متشابه فى التركيب فى كل من إنزيم الـ pol I وإنزيم الـ pol III فقط ويقوم كل إنزيم من هذه الإنزيمات بنسخ طرز معين من الچينات كما سبق ذكره.

العائلات الجينية Gene Families

معظم الجينات التى تحمل شفرات البروتينات الخلوية المختلفة تكون ممثلة فى الجينوم الأحادى (Haploid genome) بنسخة واحده (One copy) وغالباً ما يشار إلى مثل هذه الجينات بالتتابعات النيوكليوتيديه الفريدة (Unique sequence) أو التتابعات النيوكليوتيديه المفردة(Single sequence). ومع ذلك فإن بعض الجينات تتواجد فى صورة عائلة جينية(Gene family) والتى يمكن تعريفها بأنها مجموعة من الجينات المتشابهه فى التركيب والوظيفة ويختلف عدد جينات العائلة الواحدة بأختلاف العائلات الجينية وفيما يلي بعض خصائص العائلات الجينية:

١- بعض العائلات الجينية تكون جيناتها متجمعة فى نفس الموقع من الكروموسوم حيث تتكرر جينات العائلة فى صورة مكررات متتالية حيث ينفصل كل جين عن الآخر بمسافة صغيرة من الـــDNA ومن أمثلة هذا النوع من العائلات الجينية المتكررة :

أ- عائلة جينات الأحماض النووية الريبوسومية (rRNA genes) وهى الجينات التى تنسخ إلى الأنواع المختلفة من الأحماض النووية الريبوسومية rRNA، حيث تتكرر هذه الجينات آلاف المرات فى ترتيب طولى على الكروموسوم السادس فى نبات الذرة، بينما فى الإنسان يتراوح عدد جينات هذه العائلة ما بين ٥٠ إلى ٢٠٠ جين موزعة على خمسة كروموسومات مختلفة.

ب-عائلة جينات الهستون حيث تتكون العائلة الجينية من خمسة جينات متتالية بالترتيب H1-H4- H2B- H3- H2A فى قنفد البحر Sea urchin (*Lyctinus pictus*) وتتكرر العائلة الواحدة التى تضم الجينات الخمسة بالترتيب السابق عديد من مئات المرات فى صورة مكررات متتالية. ومع ذلك، يوجد ما بين ٥ إلى ٢٠ جين إضافي لكل جين من الجينات الخمسة السابقة موزعة بصورة مفرده فى مناطق أخري من الجينوم فى صورة أورفون (Orphon) وعلى ذلك يمكن تعريف الأورفون بأنه أحد جينات العائلة الجينية الموجـــود بصــــورة مفـــردة والذي يمكـــن عزلـــه وفصلـــه فى صـــورة نقـــية.

ولقد وجد فى قنفد البحر أن التعبير الچيني لچينات العائلة المتكررة يظهر فى مراحل النمو الأولى بينما يظهر التعبير الچيني للچينات المفردة أو الأورفون لنفس العائلة الچينية فى مراحل النمو المتأخرة.

٢- بعض العائلات الچينية الأخري والتى يبدو أنها نشأت عن طريق التكرار المتتالى وينفصل كل چين من چينات العائلة عن الچينات الأخرى بوجود مناطق طويلة من الـــDNA ومن أمثلة ذلك العائلة الچينية للموقع Histocompatibilty locus (H-2 locus) فى الفأر (Mice) حيث تضم هذه العائلة ٣٦ چين موزعة فى ١٣ موقع ويضم أكبر موقع منها سبعة چينات بطول ١٩١٠٠٠ نيوكليوتيدة وينفصل كل چين من هذه الچينات السبعة عن الچينات الأخرى بوجود مسافة من الـــDNA تحتوى ما بين ٧٠٠٠ إلى ٢٨٠٠٠ نيوكليوتيدة.

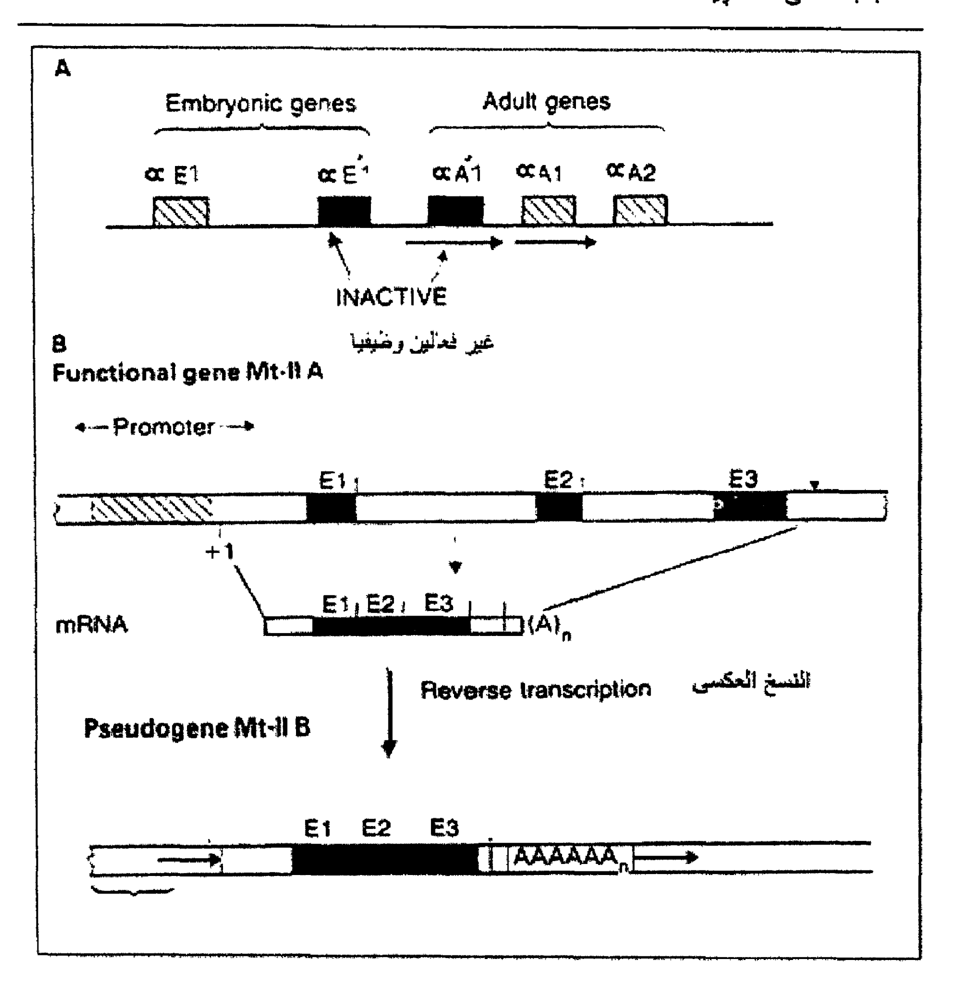
٣- بعض العائلات الچينية التى تحتوى على چينات تنتج نفس البروتين ولكن يظهر التعبير الچيني لچينات هذه العائلة فى مراحل مختلفة من النمو. فعلى سبيل المثال فإن عائلات چينات ألفاجلوبين (α globin) فى الإنسان تضم خمسة چينات تقع على الكروموسوم رقم ١٦، حيث يظهر التعبير الچيني لأحد هذه الچينات وهو الچين αE1 فى مرحلة النمو الچيني بينما يظهر التعبير الچيني لكل من الچين αA1 والچين αA2 فى الأفراد البالغة Adults (شكل ٢٥).

وفى الكائنات حقيقية النواة التى تحتوى على چينات تشترك فى إنتاج بروتين وظيفي يتركب مـــن أنواع عديدة من السلاسل عديدة الببتيد (Polypeptide chain) المختلفة لا تكون متجمعة فى موقع محـــدد مـــن الچينـــوم (Genome)، فعلـــى ســـبيل المثـــال، يقـــع چـــين ألفـــاجلوبين (α-globin) على الكروموسوم رقم ١٦ فى الإنسان بينما يقع چين البيتاجلوبين (β–globin) علـــى الكروموسوم رقم ١١ فى الإنسان. وفى الكائنات غير حقيقية النواة تكون الچينات التى تشترك فى إنتاج بروتين وظيفي متجمعة معاً فى مكان محدد من الچينوم البكتيري.

وفى الكائنات حقيقية النواة التى تحتوى على چينات تشترك فى إنتاج مجموعة من الإنزيمات المختلفة التى تشترك فى نفس الممر التخليقي الحيوي أو نفس الممر الهدمى الحيوي لا تكون متجمعة (Cluster) فى مكان محدد من الچينوم بينما فى الكائنات غير حقيقية النواة تكون هذه الچينات متجمعة فى مكان محدد من الچينوم. فعلى سبيل المثال، تكون الچينات الثلاثة التى تنتج الإنزيمات الثلاثة اللازمة لميتابوليزم سكر الجلاكتوز (Galactose) وهى:

1- Galactose- 4- epimerase
2- Galactose- 1- phosphate uridyl transferase
3- Galactokinase

موزعة على الكروموسومات ١٧،٩،١ على الترتيب فى الإنسان، بينما فى البكتيريا تكون هذه الچينات الثلاثة متجمعة فى مكان محدد من الچينوم البكتيري. ومن الواضح أنه على الرغم من انتشار چينات العائلة الچينية الواحدة فى الچينوم فى الكائنات حقيقية النواة إلا أنه يحدث تنظيم للتعبير الچيني لهذه الچينات بطريقة تعاونية حيث يحدث تعبير چيني لمجموعة من هذه الچينات وعدم التعبير الچيني للمجموعة الأخري من الچينات فى نفس الوقت استجابة لمنبه مشترك. ومن الواضح أيضاً أنه يوجد عدد قليل من الچينات التى تنظم وتتحكم فى التعبير الچيني والتى تنشط أو تُكبت (Repress) عديد من الچينات الأخري التى تحمل خصائص مشتركة.



شكل (٢٥): يوضح طرز الچينات الكاذبة (Pseudogenes)

A– الموقع الچينى للألفاجلوبين على الكروموسوم رقم ١٦ فـى الإنـسان والـذى يـضم الچينـات الفعالـة وظيفيـا αE1 و αA1 و αA2 والچينين الكاذبين αE'1 و αA'1 .

B– الچين Mt-IIA الفعال وظيفياً والذى يحتوى على إنترونين بالاضافة الى ثلاثة إكزونات بينما الچين الكاذب Mt-IIB لا يحتوى على اى إنترونات ويشابه فى تركيبه الـmRNA الناضج الناتج عـن نـسخ الچـين Mt-IIA.

الچينات الكاذبة Pseudogenes

الچينات الكاذبة هي نسخ من الچينات المكررة ولكنها غير فعالة وظيفياً وغالباً لا يحدث نسخ للچينات الكاذبة. وتوجد الچينات الكاذبة فى كل أنواع الچينات فى الكائنات حقيقية النواة سواء تلك التى تنسخ وتترجم إلى الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية أو تلك التى تنسخ فقط إلى الأنواع الأخري المختلفة من الــRNA، مثل الــrRNA وtRNA، scRNA. ويختلف عدد الچينات الكاذبة بإختلاف الچينات، فعلى سبيل المثال، فالچينات الصغيرة التى ينسخها كل من إنزيم البلمرة pol I وpol II غالباً ما تحتوى على مئات من الچينات الكاذبة بينما الچينات التى تنسخ وتترجم إلى الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية تحتوى عادة على عدد قليل من الچينات الكاذبة أقل من ٢٠ چين كاذب. وتنقسم الچينات الكاذبة إلى طرازين هما:

١- الچينات الكاذبة المماثلة فى التركيب للچين الأصلي وهذا النوع من الچينات الكاذبة تكون مرتبطة بالچين الأصلى ومماثلة له فى التركيب. وألية تكوين هذا الطراز من الچينات الكاذبة هو حدوث تكرار متتالى لمنطقة من الكروموسوم التى تحتوى على الچين الأصلي ومن أمثلة هذا الطراز من الچينات الكاذبة الموقع الچيني لچين الألفاجلوبين (α-globin) فى الإنسان حيث يحتوى هذا الموقع على ثلاثة چينات فعالة وظيفياً هى (شكل ٢٥).

أ- الچين αE1 ويظهر التعبير الچيني له فى المراحل الچينية

ب- الچين αA1 والچين αA2 ويظهر التعبير الچيني لهما فى الفرد البالغ، كما يضم هذا الموقع الچيني چينين كاذبين هما αA′1 وαE′ ومن المحتمل نشأتهما من الچين الأصلى منذ ٤٥ مليون سنة ويرجع السبب فى كونها غير فعالة وظيفياً إما لحدوث طفرات متعددة فى الچين الكاذب تسبب تغير فى الشفرات الوراثية أو إلى حدوث طفرة واحدة ينتج عنها تكوين أحد شفرات إنهاء الترجمة وبالتالى تكوين بروتين غير كامل.

٢- الچينات الكاذبة المشتقة من الــmRNA الناضج (Mature mRNA) والناتج من نسخ الچين الأصلي، وعلى ذلك فإنها لا تحتوى على الإنترونات التى توجد فى الچين الأصلي ومن أمثلة هذا الطراز من الچينات الكاذبة الچين الكاذب Metallothionin (Mt-IIB) فى الإنسان، والذي لا يحتوى على إنترونات بينما الچين الأصلي (Mt-IIA) يحتوى على إنترونين (شكل٢٥).

الترانسبوزونات The Transponsons

بالإضافة للچينات التى توجد فى چينومات الكائنات الحية، فإنه توجد طرز خاصة من التتابعات النيوكليوتيديه الطويلة أو القصيرة والتى تنتشر فى الچينوم وتعرف بالترانسبوزونات وتتميز بالخصائص التالية:

١- يتراوح طول كل تتابع نيوكليوتيدي منها ما بين ٢٠٠٠ إلى ٧٠٠٠ نيوكليوتيدة.

٢- أكثر حركة (Mobile) وتنقل داخل الچينوم ولها القدرة على التنقل من مكان إلى آخر داخل نفس الچينوم وقد تكون هذه الحركة أو التنقل لمدة جيل واحد أو لعديد من الأجيال.

٣- تتوزع بطريقة عشوائية داخل الچينوم أثناء حركتها وتنقلها.

٤- قد تسبب عند تحركها وتنقلها داخل الچينوم حدوث طفرات والتى أدت إلى اكتشافها لأول مرة بواسطة العالمة Barbara McClintock فى الذرة فى الستينات من القرن العشرين وأطلقت عليها اسم العناصر المتنقلة (Transposable elements) .

٥- يمكن الأستدلال على وجود الترانسبوزونات وتنقلها داخل الچينوم بمقارنة مناطق الـــDNA فى السلالات المختلفة لنفس الكائن.

٦- أمكن عزل الترانسبوزونات من عديد من الكائنات حقيقية النواة ووجد أنها تقع فى عديد من الأقسام تبعاً لتركيبها وليس معروفاً حتى الآن آليه أو ميكانيزم تنقل الترانسبوزونات داخل الچينوم ولكن من الواضح أن المحتوى الوراثي للكائن يلعب دوراً فى هذه الآلية.

٧- كل الترانسبوزونات يوجد على جانبيها تتابعات نيوكليوتيديه قصيرة متكررة من الـــDNA والتى يعتقد أنها تمثل المناطق التى يحدث عندها الكسر الذي تتطلبه عملية انتقال واندماج الترانسبوزونات فى مكان لآخر داخل الچينوم لكائن ما.

الساتلايت DNA Satellite DNA

بالإضافة لوجود الجينات والترانسبوزونات فى چينومات الكائنات حقيقية النواة يوجد طراز معين من التتابعات النيوكليوتيديه والتي تسمي بالساتلايت DNA وهو ذلك التتابع من النيوكليوتيدات الذى يحتوى على نفس التركيب من النيوكليوتيدات مسبباً ذلك لأن يكون حزمه من الـــDNA يمكن تمييزها عن باقى الـــDNA بواسطة عديد من الطرق المتنوعة للطرد المركزى ومن ثم جاءت تسميته بالساتلايت DNA ويتميز بما يلي:

١- أنها تتابعات نيوكليوتيديه متكرره بمعدل عالى فى صورة مكررات طويلة متتالية تصل إلى آلاف من المكررات المتشابهه نسبياً فى التركيب.

٢- يتراوح طول كل مكرره منها ما بين مكررات قصيرة تحتوى ما بين ٦ إلى ٢٠٠ نيوكليوتيدة الى مكررات طويلة تحتوى على الآلاف من النيوكليوتيدات.

٣- عادة ما يوجد بعض الأختلافات البسيطة بين هذه التتابعات المتكررة والذي من المحتمل أنها تعكس تطور هذا الساتلايت DNA بواسطة التكرار المتتالى متبوعاً بحدوث الطفرات أو حدوث النقص (Deletion).

٤- تختلف كمية الساتلايت DNA فى الكائنات حقيقية النواة ما بين ٢% الى ٥٠% من كمية الـــDNA الكلية بالچينوم كما أنها تختلف بين الأنواع قريبة الصلة من بعضها فعلى سبيل المثال تمثل كمية الساتلايت DNA فى الدروسوفيلا ڤيرليز *Drosophila virilis* بحوالى ٤٠% من كمية الـــDNA الكلية بينمـــا فى الدروسوفيلا ميلانوجستر *Drosophila melanogaster* تصل كميته الى حوالى ٨% من كمية الـــDNA الكلية بالچينوم.

٥- عديد من طراز الساتلايت DNA تحيط بالسنتروميرات (Centromeres) والتلوميرات (Telomeres) حيث تظهر بالميكروسكوب الضوئى كمناطق شديدة الصبغ تعرف باسم الهتروكروماتين (Heterochromatin) فى كروموسومات الدور الاستوائى (Metaphase) من الانقسام الميتوزى عند صبغ الخلايا المنقسمة بصبغة الفولوجين.

٦- عادة لا يحدث نسخ (Transcription) للـــDNA التابع (Satellite DNA).

الميني ساتلايت DNA　　Mini-Satellite DNA

تحتوى أيضاً چينومات الكائنات حقيقية النواة بالإضافة للچينات والترانسبوزونات والساتلايت DNA على ما يعرف باسم الميني ساتلايت DNA (Mini-Satellite DNA) وهى تتابعات نيوكليونيديه تتميز بالخصائص:

١- تتركب من عدد قليل فقط من المكررات المتتالية ذات التركيب البسيط والذى ينتشر فى الچينوم.

٢- يتميز بوجود اختلافات كبيرة فى عدد المكررات المتتالية باختلاف الأفراد فقد يكون عدد هذه المكررات المتتالية طويل فى فرد وقصير فى فرد أخر عند نفس الموقع من الـــDNA وهذه الاختلافات تستخدم لعمل بصمة خاصة من الـــDNA لكل فرد والتى يمكن استخدامها فى التحاليل الوراثية الأخرى.

تنظيم الچينوم　　Genome Organization

يمكن تعريف الچينوم Genome بأنه العدد الاحادى من الكروموسومات (Haploid number) فى أى كائن من الكائنات حقيقية النواة ويرمز له بالرمز n وهذا العدد الآحادى هو الذى يتواجد فى الجاميطات المذكرة والمؤنثة. ونظراً لأن الكائنات غير حقيقية النواة (البكتيريا) يتواجد فيها نسخة واحدة (One copy) فقط من الچينوم فإنها تسمى (Monoploid) وليست (Haploid) لأنها لا تتكاثر جنسياً ولا تكون جاميطات مذكرة أو مؤنثة.

قيمة الـــC-Value

تعرف قيمة الـــC-Value بأنها كمية الـــDNA فى الچينوم الأحادى(Haploid genome) فى الكائنات حقيقية النواة وتختلف هذه القيمة باختلاف الكائنات حقيقية النواة ففى الخميرة *S. cerevisioe* تقدر هذه القيمة بحوالى $١٠^{٧}$ زوج من النيوكليونيدات وفى بعض البرمائيات تصل الى $١٠^{١١}$ زوج من النيوكليوتيدات بينما فى الكائنات حقيقية النواة الراقية تكون هذه القيمة أكبر بكثير من تلك الكمية من الـــDNA الضرورية لقيام هذه الكائنات بوظيفتها. فعلى سبيل المثال تكون هذه القيمة الـــC-Value لچينوم الإنسان الأحادى حوالى٣×١٠^{٩} زوج من النيوكليوتيدات.

ولقد أوضحت تقديرات عدد الچينات فى الإنسان باستخدام طرق متعددة ومتنوعة أن عدد الچينات أقل من تلك الكمية بكثير وأن هناك زيادة فى كمية الـــDNA فى الچينوم الأحادى تعادل عشرة أضعاف تلك الكمية من الـــDNA اللازمة لقيام الإنسان بوظيفته الطبيعية.

ولقد وجد أن هذه القيمة الـــC-Value داخل قسم ما بين الكائنات حقيقية النواة تتراوح من قيمة دنيا (Minimum) الى قيمة قصوى (Maximum) وأن القيمة القصوى تعادل مائة ضعف القيمة الدنيا داخل قسم ما من الكائنات حقيقية النواة، وهذا المجال الواسع لهذه القيمة فى قسم ما من الكائنات حقيقية النواة تعرف باسم (C-value paradox) .

وعموماً فإن قيمة الـــC-Value تزداد كلما ازداد حجم الچينوم (جدول ٢)

جدول (٢): يوضح حجم الـــچينوم فى بعض الكائنات مقدراً بالكيلو لأزواج القواعد (kbp)

الكائن **Organism**	حجم الـــچينوم **Size of genome (kbp)**
SV40	5.1
Vaccinia virus	190
E. coli	4000
S. cervisioe	13500
Drosophila	165000
Man	2900000

وعلى الرغم من اختلاف هذه القيمة C-value باختلاف أنواع الكائنات المختلفة والتى تزداد مع زيادة الكائنات فى التعقيد إلا أن هذه الكمية (C-value) تكون ثابتة فى أفراد النواع الواحد سواء كان نبات أو حيوان وهذه هى إحدى الحقائق العلمية المؤكد حتى الآن.

الباب الثالث

الشفرة الوراثية والتخليق الحيوى للبروتين

The Genetic Code
and
Protein Biosynthesis

أولاً: الشفرة الوراثية   The Genetic Code

مما لا شك فيه أن التعبير الچينى للچينات يتم من خلال إنتـــاج الچينـــات للبروتينـــات الخلوية عن طريق نـــسخ (Transcription) الچـــين وتكـــوين الــــmRNA والـــذى يتـــرجم (Translation) بواسطة الريبوسومات الى البروتين على النحو التالى:

	Transcription		Translation	
DNA	⟶	mRNA	⟶	Protein
Gene	نسخ الچين		الترجمة	بروتين

ونظراً لأن أى بروتين يتركب من عدد معين وبترتيب ثابت ومحدد من الأحماض الأمينية فإن تتابع وترتيب القواعد فى جزىء الــmRNA هو الذى يحدد ويملى عدد وطبيعة الأحماض الأمينينة فى البروتين الناتج ونظراً لأن أى چين (Gene) يتركب من تتابع معين ومحدد من القواعد الأربعة وهى الأدينين Adenine (A) والجوانين Guanine (G) والسيتوسين Cytosine (C) والثيمين Thymine (T) والتى يختلف عددها وترتيبها بإختلاف الچينات فإن السؤال الذى يطرح نفسه هو:

كيف يمكن للأنواع الأربعة من القواعد السابقة أن تعبر عن الأحماض الأمينية الأساسية العشرين والتى تدخل فى بناء وتركيب كل الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية؟

ويعتبر العالم چورچ چامو (George Gamow) هو أول من قدم تصوراً نظرياً للإجابة على السؤال السابق حيث أقترح أن التعبير عن الأحماض الأمينية المختلفة فى البروتين يكون من خلال شفرة وراثية Genetic Code تتركب من تتابع محدد وثابت من ثلاثة قواعد من القواعد الأربعة و السابقة الذكر والتى تدخل فى تركيب الچين وذلك للأسباب التالية:

١- إذا عبرت كل قاعده واحدة من القواعد الأربعة (C, T, G, A) عن حامض أمينى فسوف تتكون أربعة شفرات (Codons) فقط كل منها تعبر عن حامض أمينى معين، وهذا العدد من الشفرات لا يكفى للتعبير عن كل الأحماض الأمينية العشرين.

٢- إذا عبرت كل قاعدتين من القواعد الأربعة ($٤^٢$) عن حامض أمينى معين فسوف تتكون ١٦ شفرة لتعبر عن ١٦ حامض أمينى، وأيضاً هذا العدد من الشفرات مازال غير كافى للتعبير عن كل الأحماض الأمينية العشرين.

٣- إذا عبرت كل ثلاثة قواعد من القواعد الأربعة ($٤^٣$) عن حامض أمينى معين فسوف نحصل على ٦٤ شفرة، وهذا العدد من الشفرات يكون كافياً للتعبير عن الأحماض الأمينية العشرين.

تعيين وتحديد الشفرة الوراثية

Determination and Identification of the Genetic Code

يعتبر تعيين وتحديد الشفرات الوراثية المختلفة للأحماض الأمينية العشرين من أهم الإنجازات العلمية التى تحققت فى الستينات من القرن العشرين وذلك عن طريق الأبحاث التى أجراها العالمين نيربرج (Nirenberg) وكورانا (Khorana) عام ١٩٦١ حيث استخدما طرق بحثية مختلفة لحل لغز الشفرة الوراثية وتتلخص هذه الطرق فيما يلى:

١- طريقة تخليق خيط من الـــRNA صناعياً (Artificial RNA) يتركب من نوع واحد من القواعد.

ففى عام ١٩٦١ اكتشف العالم (Nirenberg) إنزيم بكتيرى فى البكتيريا *E. coli* يسمى (Polyribonucleotide phosphorylase) يستطيع تحفيز تخليق خيط من الـــRNA فى أنبوبة الاختبار فى وجود الوحدات البنائية الأربعة فى صورة ثنائية الفوسفات وهى UDP, CDP, GDP, ADP وذلك دون الحاجة إلى وجود خيط مطبعى يستخدمه هذا الإنزيم لتخليق خيط الـــRNA من هذه الوحدات البنائية. كما وجد هذا العالم أيضاً أنه إذا وضع هذا الخيط من الـــRNA الصناعى فى أنبوبة اختبار تحتوى على مكونات النظام اللازم لتخليق البروتين من ريبوسومات وإنزيمات وكل الأحماض الأمينية العشرين وكل الـــtRNA فإنه يتكون سلسله عديدة الببتيد (Polypeptide chain) يمكن عزلها وفصلها وتنقيتها ومعرفة ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية بها. ولقد استخدم هذا العالم هذه الطريقة لتخليق خيوط من الـــ RNA الصناعية يحتوى كل منها على نوع واحد من القواعد فقط على النحو التالى:

أ- تخليق خيط من الـــ RNA يتكون فقط من عديد من قواعد اليوراسيل (PolyU)

$$(UDP)_n \xrightarrow{\text{Enzyme}} \frac{\text{UUUUUUU}}{\quad} \text{Poly U}$$

ب- تخليق خيط من الـــRNA يتركب فقط من عديد من قواعد الأدينين (Poly A)

$$(ADP)_n \xrightarrow{\text{Enzyme}} \frac{\text{AAAAAAA}}{\quad} \text{Poly A}$$

ج- تخليق خيط من الـــRNA يتركب من عديد من قواعد السيتوسين (Poly C)

$$(CDP)_n \xrightarrow{\text{Enzyme}} \frac{\text{CCCCCCC}}{\quad} \text{Poly C}$$

ولم يتمكن هذا العالم من تخليق خيط الـ RNA يتركب من الجـوانين فقـط (Poly G) وذلـك لوجود صعوبات فنية ولقد استخدم هذه الخيوط من الـRNA المخلقة صناعياً فى تخليق سلاسل عديدة الببتيد بوضع كل منهما بمفرده فى أنبوبة أختبار تحتوى على كل المكونات اللازمة لتخليق البروتين السابق ذكرها وكانت النتائج على النحو التالى:

أ- عند استخدام خيط الـRNA المكون من اليوراسيل فقط (Poly U) تكونت سلاسل عديدة الببتيد تتركب من الحامض الأمينى فينايل ألانين Phenylalanine (ph) فقط وبذلك استنتج أن الشفرة (Codon) الخاصة بهذا الحامض الأمينى هى ثلاثية من اليوراسيل (UUU)

Poly U + النظام الكامل لتخليق البروتين ⟶ ph – ph – ph – ph – ph.

ب- عند استخدام خيط الـRNA المكون من عديد من قواعد الأدينين (Poly A) فقط تكونت سلاسل عديدة الببتيد تتركب من الحامض الأمينى الليسين Lysine (lys) فقط وبذلك استنتج أن الشفرة (Codon) الخاصة بهذا الحامض الأمينى هى ثلاثية من الأدينين (AAA)

Poly A + النظام الكامل لتخليق البروتين ⟶ lys – lys – lys – lys – lys.

ج- عند استخدام خيط الـRNA المكون من عديد من قواعد السيتوسين (Poly C) فقط تكونت سلاسل عديدة الببتيد تتركب من الحامض الأمينى البرولين Proline (pro) فقط وبذلك استنتج أن الشفرة (Codon) الخاصة بهذا الحامض الأمينى هى ثلاثية من السيتوسين (CCC)

Poly C + النظام الكامل لتخليق البروتين ⟶ pro – pro – pro – pro – pro.

٢- طريقة تخليق خيط من الــRNA يتركب من ترتيب معروف من نوعين من القواعد فقط بصورة متبادلة.

وفى هذه الطريقة استخدمت كل من الطرق الإنزيمية والتخليق الكيميائى فى تخليق خيط طويل من الـ RNA يتركب من الجوانين (G) واليوراسيل (U) فقط على سبيل المثال على النحو التالى

.... GUGUGUGUGUGUGU...........

وعند وضع هذا الخيط من الـ RNA فى أنبوبة اختبار تحتوى على كل النظام الكامل لتخليق البروتين تكونت سلاسل عديدة الببتيد تتركب من نوعين من الأحماض الأمينية فى صورة متبادلة هما الفالين (Valine (val والسستين (Cystein (cys كما يلى:

... GUG UGU GUG UGU GUG UGU....
↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
val – cys – val – cys – val – cys

وبذلك استنتج هذا العالم أن الشفرة الوراثية للحامض الأمينى الفالين هى (GUG) بينما الشفرة الوراثية للحامض الأمينى السستين هى (UGU).

٣- طريقة تخليق خيط من الــRNA صغير جداً يتركب من ثلاثة قواعد فقط والتى تعرف باسم الرسالة الصغيرة Mini-messenger RNA

وجد أن جزيئات خيط الــRNA الصغيرة جداً والتى تتركب من ثلاثة قواعد فقط يستطيع الريبوسوم (Ribosome) الارتباط بها وبالتالى أرتباط الحامض النووى الناقل tRNA وما يحملهِ من حامض أمينى بهذه الرسالة الصغيرة وبذلك يمكن فصل المركب المكون من الريبوسوم والــtRNA وما يحمله من حامض أمينى عن باقى المكونات الأخرى التى تمثل كل النظام الكامل لتخليق البروتين ومن ثم يمكن تحديد الحامض الأمينى الذى أرتبط بمثل هذه الشفرة الثلاثية (Codon). ولقد تم تخليق مثل هذه الشفرات (Codon) الثلاثية والتى تتركب من ثلاثة قواعد فقط بترتيب معين ومعروف حيث أمكن تخليق كل الأربعة وستون (٦٤) شفرة (Codon)

ثلاثية والتى تمثل كل التوافيق الممكنة بين القواعد النيتروجينية الأربعة (٤^{٣}= ٦٤) باستخدام الطرق الكيميائية. فعلى سبيل المثال وجد أن الشفرة الثلاثية GUG يرتبط بها الريبوسوم والحامض النووى الناقل tRNA الذى يحمل الحامض الأميني الفالين (Valine). وبهذه الطريقة أمكن تحديد كل الشفرات (Codons) للأحماض الأمينية الأساسية العشرين. كما أكدت هذه الطريقة طبيعة الشفرة الثلاثية (جدول ٣).

جدول(٣) : الشفرات الورثية Genetic codons للأحماض الأمينية الأساسية العشرين.

First letter	Second letter: U	C	A	G	Third letter
U	UUU } Phe UUC UUA } Leu UUG	UCU } Ser UCC UCA UCG	UAU } Tyr UAC UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC UGA Stop UGG Trp	
C	CUU } Leu CUC CUA CUG	CCU } Pro CCC CCA CCG	CAU } His CAC CAA } Gln CAG	CGU } Arg CGC CGA CGG	
A	AUU } Ile AUC AUA AUG Met	ACU } Thr ACC ACA ACG	AAU } Asn AAC AAA } Lys AAG	AGU } Ser AGC AGA } Arg AGG	
G	GUU } Val GUC GUA GUG	GCU } Ala GCC GCA GCG	GAU } Asp GAC GAA } Glu GAG	GGU } Gly GGC GGA GGG	

ويلاحظ أن شفرة البداية AUG تعبر عن الحامض الأميني ميثيونين (Methinine) وثلاثة شفرات لإنهاء الترجمة (UAA أو UAG أو UGA). كذلك يلاحظ أن جميع الأحماض الأمينية يعبر عنها ما بين شفرتين (Codons) إلى ستة شفرات بإستثناء الحامض الأميني الترتبوفان (Tryptophan) يعبر عنه بشفرة واحدة وهى (UGG).

مرادفات الشفرة الوراثية Synonymous In The Genetic Code

مع حلول عام ١٩٦٤ أمكن معرفة الشفرات (Codons) الأربعة وستون ووجد من بينها شفرة البداية (Initiation codon) وهى الشفرة (AUG) وثلاثة شفرات أُخرى تمثل شفرات إنهاء الترجمة (Stop codons) وهى الشفرات (UAG) أو (UAA) أو (UGA). ونظراً لوجود ٦١ شفرة وراثية مختلفة وأنه يوجد عشرين حامض أمينى فقط فسوف يوجد أكثر من شفرة واحدة لتعبر عن نفس الحامض الأمينى وهذا ما يعرف بالمرادفات فى الشفرة الوراثية فعلى سبيل المثال يعبر عن الحامض الأمينى البرولين (Proline) بأى شفرة من الشفرات الأربعة (CCA) أو (CCG) أو (CCC) أو (CCU). كذلك وجد أن الشفرات المختلفة التى تعبر عن نفس الحامض الأمينى تختلف عن بعضها فى القاعدة الثالثة من يمين الشفرة وأن هذه الظاهرة شائعة بالنسبة لكل الأحماض الأمينية التى يعبر عنها بأكثر من شفرة. ولقد أكدت الأبحاث أن عدد الأحماض النووية الناقلة tRNAs الموجودة بالخلية أقل بكثير عن عدد الشفرات الوراثية وبذلك يستطيع الحامض النووى الناقل tRNA الخاص بنقل حامض أمينى معين التعرف على هذه الشفرات المختلفة لنفس الحامض الأمينى حيث يكون للقاعدة الثالثة فى يمين الشفرة المضادة (Anticodon) الموجودة بالـــtRNA درجة من الترنح (Wobble) تسمح لها بالاقتران مع القاعدة الثالثة فى يمين الشفرة (Codon) . فعلى سبيل المثال يعبر عن الحامض الأمينى البرولين بأى شفرة من الشفرات (CCA) أو (CCG) أو (CCC) أو (CCU) وأن الشفرة المضادة (Anticodon) الموجودة فى الـــtRNA الذى يحمل هذا الحامض الأمينى هى (GGU) وبذلك تستطيع القاعدة يوراسيل U فى هذه الشفرة المضادة الاقتران بالأدينين (A) أو الجوانين (G) أو السيتوسين (C) أو اليوراسيل (U) والتى تمثل القاعدة الثالثة فى يمين الشفرات (CCA) أو (CCG) أو (CCC) أو (CCU) وتعرف هذه الظاهرة بنظرية الترنح (Wobble hypothesis) فى الشفرة الوراثية وهذا يفسر قلة الأحماض النووية الناقلة tRNAs بالخلية عن عدد الشفرات الوراثية. ووجود المرادفات وكذلك ظاهرة الترنح فى الشفرة الوراثية يؤدى إلى إنخفاض التأثير الضار الناشىء عند حدوث الطفرة عند مستوى زوج من القواعد إلى أدنى مستوى له حيث أنه

قد تؤدى الطفرة إلى تكوين إحدى الشفرات المتعددة لنفس الحامض الأمينى وعلى ذلك يمكن تلخيص أهم خصائص الشفرة الوراثية فى النقاط التالية:

١- يعبر عن الشفرة الوراثية(Genetic code) بتتابع معين ومحدد من ثلاثة قواعد على طول الرسالة الوراثية المحمولة بواسطة mRNA.

٢- لا توجد فواصل بين الشفرات الثلاثية المتتالية على طول الرسالة الوراثية (mRNA) تفصل بين شفرة وأخرى أو بين مجموعة من الشفرات الوراثية على طول الرسالة الوراثية (mRNA).

٣- يوجد ظاهرة المرادفات (Synonymous phenomena) فى الشفرة الوراثية والتى تعنى وجود أكثر من شفرة (Codon) مختلفة تعبر عن نفس الحامض الأمينى.

٤- يوجد ظاهرة الترنح (Wobble hypothesis) فى الشفرة الوراثية والتى تعنى أن نفس الحامض النووي الناقل (tRNA) يستطيع التعرف على أكثر من شفرة لنفس الحامض الأمينى.

٥- يبدأ دائما ترجمة الرسالة الوراثية (mRNA) بواسطة الريبوسوم عن طريق أرتباطه بشفرة بداية الترجمة (AUG) حيث يتم وضع أول حامض أمينى فى السلسلة عديدة الببتيد وهو الحامض الأمينى ميثيونين (Methionine) فى الكائنات حقيقية النواة والحامض الأمينى فورمايل ميثيونين (Formyl methonine) فى الكائنات غير حقيقية النواة.

٦- تنتهى ترجمة الرسالة الوراثية mRNA بواسطة الريبوسوم عندما يصل إلى أى شفرة من شفرات إنهاء الترجمة الثلاثة (UAG أو UAA أو UGA) حيث لا يوضع أى حامض أمينى فى السلسلة عديدة الببتيد عندما يصل الريبوسوم إلى أى شفرة من هذه الشفرات الثلاثة.

٧- الشفرة الوراثية غير متداخلة (Non-overlapping) بمعنى أن كل ثلاثة قواعـد متتاليـة تمثل شفرة معينة وأن كل قاعدة فى هذه الشفرة هى جزء منها وليست أجزاء من شفرات متعـددة .

عمومية الشفرة الوراثية **Universality of the Genetic Code**

على الرغم من أن معظم المعلومات حول الشفرة الوراثية من حيث طبيعتها وتحديدها جاءت من الأبحاث التى أجريت على البكتيريا *E. coli* ، إلا أنه أمكن الحصول على نفس النتائج باستخدام كائنات أخرى مثل الامفيبيا (Amphibia) والثدييات (Mammalian) وكذلك الأنسجة النباتية. ولقد أجمعت نتائج هذه الأبحاث على أن الشفرة الوراثية (Genetic code) عامة (Universal) فى كل الكائنات الحية سواء الراقية أو غير الراقية وهذا يعنى أن الشفرة سواء فى الڤيرس أو الإنسان وهو أرقى الكائنات الحية ثابتة. وتقدم عمومية الشفرة الوراثية دليل قوى على أنه منذ أن وجدت الحياة على الأرض حيث ظهرت أول صور الحياة منذ ثلاثة بلايين عام حيث وجدت الشفرة الوراثية كان هناك انتخاب قوى تجاه هذه الشفرة لكى تستمر بدون تغير وذلك لأن التغير فى شفرة واحده سوف يترتب عليه تغيير حامض أمينى ما فى كثير من البروتينات والذى سوف ينتج عنه تأثير ضار بالكائن وربما يكون لمثل هذه الطفرات تأثير مميت (Lethal) وهذا يفسراستمرار ثبات الشفرة الوراثية بدون تغير منذ أن بدأت الحياة على الأرض.

أنواع الطفرات التى تحدث فى الشفرة الوراثية **Mutation in the Genetic Cod**

فى عام ١٩٥٧ قدم العالم Veren Ingram أول دليل مباشر على أن الچينات تحمل الشفرات الخاصة لإنتاج البروتينات المختلفة وذلك بمقارنة تحليل بروتين الهيموجلوبين الطبيعى فى خلايا الدم الحمراء ببرويتن هيموجلوبين خلايا الدم المنجليه فى الإنسان حيث وجد أن الأختلاف بينهما يرجع إلى إحلال الحامض الأمينى ڤالين (Valine) فى هيموجلوبين خلايا الدم المنجليه بالحامض الأمينى جلوتاميك (Glutamic) فى هيموجلوبين كرات الدم الحمراء الطبيعية. ولقد وجد أن هذا الإحلال للحامض الأمينى يرجع إلى حدوث طفرة فى شفرة الحامض الأمينى جلوتاميك (GAA) سببت هذه الطفره فى تكوين الشفرة (GUA) وهى شفرة الحامض الأمينى ڤالين ويمكن تقسيم الطفرات التى تحدث فى الشفرة الوراثية على النحو التالى:

١- **الطفرات الساكنة (Silent mutations)** وتنشأ هذه الطفرات الساكنة إذا حدث تغير للقاعدة الثالثة من يمين الشفرة الوراثية والذى ربما يؤدى هذا التغير إلى تكوين شفرة أخرى لنفس الحامض الأمينى وذلك لوجود ظاهرة المرادفات فى الشفرة الوراثية وبذلك لن يحدث تغير للحامض الأمينى رغم حدوث الطفره وبالتالى لن يحدث تغير للبروتين الناتج. فعلى سبيل المثال إذا حدثت طفره فى الشفرة الوراثية للحامض الأمينى برولين (GGT) تسببت فى تغيير القاعدة الثالثة (T) إلى قاعدة الأدينين (A) وبالتالى تصبح هذه الشفرة بعد حدوث الطفره هى GGA فإن هذه الشفرة مازالت تعبر عن نفس الحامض الأمينى البرولين لوجود المرادفات فى الشفرة الوراثية.

٢- **الطفرات الخاطئة المعنى (Miss-sense mutations)** وينشأ هذا النوع من الطفرات إذا حدث التغير فى القاعدة الأولى شمال الشفرة والذى يترتب عليه إحلال حامض أمينى محل آخر فى البروتين الناتج وبالتالى ينتج بروتين طافر. فعلى سبيل المثال إذا حدث تغير فى القاعدة الأولى فى شفرة الحامض الأمينى برولين (GGT) وهى الجوانين (G) ليحل محلها القاعدة أدينين (A) فسوف يتبع ذلك تغير هذه الشفرة تماماً لهذا الحامض الأمينى البرولين ليحل محله الحامض الأمينى السيرين serin (AGT) وبالتالى ينتج بروتين طافر.

٣- **الطفرات ذات المعنى (Sense mutations)** وينشأ هذا النوع من الطفرات إذا حدث تغير فى القاعدة الثالثة يمين الشفرة ترتب عليه تكوين إحدى شفرات إنهاء الترجمة المبكرة والذى يترتب عليه تكوين بروتين غير كامل التكوين ويصبح بروتين طافر فعلى سبيل المثال إذا حدث تغير فى القاعدة الثالثة يمين الشفرة ATG بإحلال السيتوسين (C) محل الجوانين (G) فإنه يترتب علي ذلك تكوين إحدى شفرات إنهاء الترجمة المبكرة (ATC) وبالتالى يتوقف استمرار تكوين البروتين ويتكون بروتين ناقص (بروتين طافر).

٤- **طفرات تغيير القالب الشفرى (Frameshift mutations)** ينشأ هذا النوع من الطفرات إما عن طريق إضافة (Addition) قاعدة واحده أو نقص (Deletion) قاعدة واحدة عن طريق الخطأ عند تضاعف الـــDNA وفى كلا الحالتين يحدث تغير كامل لكل الشفرات أو غالبيتها تبعاً لمكان النقص أو الإضافة وبالتالى يتكون بروتين طافر.

تطور الشفرة الوراثية Evolution of the Genetic Code

على الرغم من أن الشفرة الوراثية عامة وثابتة فى جميع الكائنات الحية والفيروسات إلا أنه توجد نظريتين لمنشأ الشفرة الوراثية هما:

١- **نظرية الحفظ بالصدمة** (Frozen accident theory) وتقترح هذه النظرية أن الشفرة الوراثية نشأت بالصدفة وأنها لم تتغير لأن الأنتخاب كان فى صالح هذه الشفرات الوراثيه مما أدى إلى ثباتها وعدم تغيرها .

٢- **النظرية التطورية** (Evolutionary theory) وتقترح هذه النظرية أن الشفرات الوراثية المختلفة نشأت وتطورت وأشتقت من شفرات وراثية أولية. ومع ذلك فإن النظرية الأولى هى الأكثر قبولاً وتأييداً على الرغم من أن الشفرات الحالية يحتمل أنها ليست هى الأفضل بالنسبة للكائنات الحية فعلى سبيل المثال يوجد ستة شفرات مختلفة للحامض الأمينى الأرجنين (Arginine) بينما الإحتياج الحقيقى لهذا الحامض الأمينى فى البروتينات المختلفة هو يكفى وجود شفرتين أو ثلاثة للتعبير عنه وكذلك فإن الحامض الأمينى الليسين (Lysine) له شفرتين مختلفتين بينما الاحتياج الحقيقى لهذا الحامض الأمينى يتطلب وجود أكثر من شفرتين له وذلك لتواجده فى معظم البروتينات الخلوية. ومهما يكن الحدث الذى حدث بالنسبة لمنشأ الشفرة الوراثية فإن نظرية منشأ الشفرة الوراثية وحفظها بالصدفة كان بمثابة حدث قاطع وذلك لأن الأحماض الأمينية هى المسئولة عن تكوين البروتينات فى كل الكائنات الحية والموجودة حالياً على الأرض.

ثانياً: التخليق الحيوى للبروتين Protein Biosynthesis

من المعروف أن معظم الجينات تبدى تأثيرها من خلال إنتاجها للبروتينات سواء كانت بروتينات تركيبية وهى التى تدخل فى بناء مكونات الخلية أو مكونات الأنسجة والأعضاء المختلفة للكائن الحى أو قد تكون بروتينات وظيفيه وهى التى تقوم بوظيفة داخل الخلية مثل الإنزيمات. وتعتبر البروتينات جزيئات كبيرة معقدة التركيب حيث يبدى بعضها درجة عالية من التخصص الوظيفى مثل الإنزيمات التى تحفز التفاعلات الكيميائية الحيوية المختلفة بالخلية، وهذا يبين ويوضح لماذا يكون للچين عادة تأثير متخصص أو تأثير محدد على الشكل المظهرى(Phenotype) للكائن.

وعموماً تتركب البروتينات إما من نوع واحد من السلاسل عديدة الببتيد أو أكثر من نوع واحد من السلاسل عديدة الببتيد كما في حالة بروتين الجلوبين (Globin) فى الإنسان حيث يتركب جزيء الجلوبين الكامل والفعال وظيفياً من أربعة سلاسل عديدة الببتيد اثنين منهما متماثلين ومتطابقين وتسمى السلاسل عديدة الببتيد ألفا (α–chains) وأثنين آخرين متماثلين ومتطابقين وتسمى السلاسل عديدة الببتيد بيتا (β–chains) وتتركب السلسله ألفا (α–chain) من ١٤١ حامض أمينى بتتابع معين ومحدد بينما تتركب السلسله بيتا (β-chain) من ١٤٦ حامض أمينى بتتابع محدد أيضاً. وبذلك يوجد جينين هما الجين A والذى ينسخ ويترجم إلى السلاسل عديدة الببتيد ألفا (α–chains) والجين B والذى ينسخ ويترجم إلى السلاسل عديدة الببتيد بيتا (β–chains).

وتتركب السلسلة عديدة الببتيد من تتابع معين ومحدد من الأحماض الأمينية والتى ترتبط ببعضها عن طريق عديد من الروابط الببتيدية (Peptide bonds) بين مجموعة الكربوكسيل فى أول حامض أمينى مع مجموعة الأمينو فى الحامض الأمينى الثانى وهكذا يتوالى تكوين هذه الروابط الببتيدية على طول السلسلة عديدة الببتيد حيث تنتهى السلسلة عديدة الببتيد بحامض أمينى يحتوى على مجموعة كربوكسيل حره بينما تبدأ هذه السلسلة عديدة الببتيد بحامض أمينى يحتوى على مجموعة أمينو حره. وعموماً يوجد عشرون حامض أمينى أساسى (شكل ٢٦) تدخل فى بناء وتركيب كل البروتينات الخلوية الطبيعية وتختلف هذه البروتينات عن بعضها فيما يلى:

١– عدد وأنواع السلاسل عديدة الببتيد فى كل بروتين.

٢– عدد وتتابع أو ترتيب الأحماض الأمينية فى السلسله الواحده حيث يتراوح عددها فى السلسله الواحده ما بين ٥١ حامض أمينى كما فى بروتين هرمون الأنسولين (Insulin) إلى أكثر من ١٠٠٠ حامض أمينى كما فى بروتين الفيبروين (Fibroin) وهو بروتين الحرير الطبيعى ويعرف ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية فى السلسلة عديدة الببتيد بالتركيب الأولى (Primary structure) للبروتين وهذا الترتيب يحدده ويمليه ترتيب القواعد الأربعة (C, G, T, A) فى جين ما وسوف نتناول فيما يلى الآلية التى يتم من خلالها التعبير الجينى للجينات من خلال التخليق الحيوى للبروتين والذى يحدث على مرحلتين هما:

أولاً: نسخ الچين Gene Transcription

وهى العلمية التى يتم بواسطتها نسخ وانتقال المعلومات الوراثية الموجوده فى چين ما (التتابع النيوكليوتيدى فى الچين) إلى السيتوبلازم عن طريق نسخ الحامض النووى الرســول Messenger RNA (mRNA) . وتتم عملية نســخ الچين بواسطـــة إنزيم البلمرة RNA polymerase والذى يستخدم الخيط الشفرى (Coding strand) من الچين وهو الخيط الذى إتجاهه $3' \rightarrow 5'$ كخيط مطبعى (Template) لتخليق خيط الـــ mRNA والذى يتم تخليقه فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ وذلك عن طريق الاقتران بين النيوكليوتيدات المكمله فى كل من الـــ mRNA وخيط الـــ DNA الشفرى وتكوين الرابطة فوسفودايستر (Phosphodiester) التى تربط النيوكليوتيدات ببعضها فى خيط الـــ mRNA وسوف نتناول الطبيعة الكيميائية لنسخ الچين وتكوين جزيئات الـــmRNA الناضجة (Mature mRNA) فى الكائنات حقيقية النواة وكذلك نسخ الچينات فى الكائنات غير حقيقية النواة فيما بعد بالتفصيل (الباب الرابع) وبوجه عام تنتهى عملية نسخ الچين وتكوين جزيئات الأحماض النووية الرسول mRNAs وبعد انتهاء نسخ الچين وتخليق الـــmRNAs فإنه يترك النواة ويذهب إلى السيتوبلازم لترجمته إلى البروتين المناسب.

H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ $(CH_2)_3$ NH $C=NH_2$ NH_2 Arginine (Arg / R)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 CH_2 C = O NH_2 Glutamine (Gln / Q)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 Phenylalanine (Phe / F)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 OH Tyrosine (Tyr / Y)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 N H Tryptophan (Trp, W)
H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ $(CH_2)_4$ NH_2 Lysine (Lys / L)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ H Glycine (Gly / G)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_3 Alanine (Ala / A)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 HN N Histidine (His / H)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 OH Serine (Ser / S)
H_2 C H_2C CH_2 $H_2N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ Proline (Pro / P)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 CH_2 COOH Glutamic Acid (Glu / E)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 COOH Aspartic Acid (Asp / D)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ H – C – OH CH_3 Threonine (Thr / T)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 SH Cysteine (Cys / C)
H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 CH_2 S CH_3 Methionine (Met / M)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 CH CH_3 CH_3 Leucine (Leu / L)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH_2 C = O NH_2 Asparagine (Asn / N)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ $HC-CH_3$ CH_2 CH_3 Isoleucine (Ile / I)	H $H_3N^+ - {}^{\alpha}C - COO^-$ CH CH_3 CH_3 Valine (Val / V)

شكل ٢٦ : يوضح تركيب الأحماض الأمينية العشرين الأساسية التى تدخل فى تركيب البروتينات المختلفة

ويلاحظ أن كل حامض أميني يحتوى على مجموعة أمينو Amino group (NH^+_3) ومجموعة حامضية Acid group (Coo-) .

ثانياً: ترجمة الـmRNA mRNA Translation

تمثل هذه العملية تدفق المعلومات الوراثية من الجينات عن طريق جزيئات (mRNA) إلى السيتوبلازم حيث تتغير لغة التعبير المستخدمة، فعند نقل المعلومات من الجين (DNA) وتكوين خيط الـmRNA تظل لغة التغيير المستخدمة كما هي والتى تتمثل فى التتابع النيوكليوتيدي فى كل من الخيط الشفري (Coding strand) من الجين وكذلك التتابع النيوكليوتيدي المكمل فى خيط الـmRNA والذى يترجم إلى البروتين المناسب حيث تتغير لغة التعبير من التتابع النيوكليوتيدي فى خيط الـmRNA إلى تتابع من الأحماض الأمينية فى البروتين المناسب وتعرف هذه العملية بالترجمة (Translation). ومما لاشك فيه أن الأحماض الأمينية لا تستطيع بمفردها الذهاب إلى الريبوسومات (Ribosomes) الخلوية لتكوين البروتين المناسب وكذلك لا تستطيع بمفردها تحديد موقعها الدقيق فى السلسلة عديدة الببتيد ولكى يتم إنجاز هذه المهمة داخل الخلية فإن ذلك يتم بمساعدة كل من الأحماض النووية الناقلة (tRNAs) وكذلك بعض الإنزيمات الخلوية والتى تتعرف على كل من الأحماض الأمينية وكذلك على الأحماض النووية الناقلة (tRNAs) التى تقوم بحمل ونقل الأحماض الأمينية ووضعها فى مكانها الصحيح من السلسلة عديدة الببتيد وذلك لأحتواء هذه الإنزيمات على موقعين أحدهما للتعرف على الحامض الأميني والآخر للتعرف على الحامض النووى الناقل (tRNA) الذي يحمل هذا الحامض الأميني ويتم إنجاز هذه المهمة كما يلى (شكل ٢٧)

- تنشيط الأحماض الأمينية (Amino acids activation) نظراً لأن الأحماض النووية الناقلة tRNA هى التى تقوم بحمل ونقل الأحماض الأمينية ووضعها فى مكانها الصحيح من السلسلة عديدة الببتيد عن طريق الريبوسومات (Ribosomes) الخلوية، فإن ذلك يتطلب تنشيط الأحماض الأمينية بالطاقة اللازمة التى يمكنها من الأرتباط بالحامض النووى الناقل tRNA حيث يرتبط كل حامض أميني بالمركب الغنى بالطاقة ATP بمساعدة إنزيمات (AATS) Amino acyl-tRNA synthetase على النحو التالى:

$$\text{Amino Acid (AA)} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{Enzyme}]{\text{AATS}} \text{AA} \sim \text{AMP} + \text{P} \sim \text{P}$$

وبذلك يرتبط الحامض الأميني (AA) بالمركب الغنى بالطاقة (AMP) وهو الأدينوزين أحادى الفوسفات. وهذا الحامض الأميني المنشط يحتوى على الطاقة اللازمة لأرتباطه بالحامض النووى الناقل tRNA. وتحتوى الخلية الحية سواء فى الكائنات حقيقية النواة أو غير حقيقية النواة على عشرين نوع من إنزيمات الـــ(AATS) ، حيث يقوم كل نوع من هذه الإنزيمات بالتعرف على كل من:

أ- الحامض الأميني الذي يجب أن يساعد فى تنشيطه.

ب- الحامص النووى الناقل tRNA والذي يقوم بنقل الحامض الأميني ووضعه فى مكانه الصحيح من السلسلة عديدة الببتيد بواسطة الريبوسومات الخلوية وذلك لأحتواء كل إنزيم من هذه الإنزيمات (AAST) علي موقعين للتعرف أحدهما للتعرف على الحامض الأميني والآخر للتعرف علي الحامض النووى الناقل tRNA.

ج- نقل الحامض الأميني المنشط إلى الحامض النووى الناقل tRNA المناسب، حيث يقوم نفس الإنزيم الذي استخدم فى الخطوة السابقة فى المساعدة على نقل الحامض الأميني المنشط إلى الحامض النووى الناقل tRNA المناسب من خلال تعرفه على الـــtRNA حيث يرتبط الحامض الأميني بالـــtRNA عن طريق رابطة اسايل (Acyl bond) بين مجموعة الهيدروكسيل ($3'$-OH) فى السكر الموجود بنيوكليوتيده الأدينين (A) الطرفية فى الـــtRNA وبين مجموعة الكربوكسيل الموجودة بالحامض الأميني ويتحرر الأدينوزين أحادى الفوسفات (AMP) على النحو التالى:

$$\text{AA- AMP} + \text{tRNA} \xrightarrow[\text{Enzyme}]{\text{AATS}} \text{AA} - \text{tRNA} + \text{AMP}$$

٢- تجميع الأحماض الأمينية فى البروتين المناسب: وهى الخطوة الثانية فى التخليق الحيوي للبروتين ويقوم بها الريبوسومات الخلوية، ويتركب الريبوسوم الكامل (70S) فى الكائنات غير حقيقية النواة من وحدتين ريبوسوميتين هما 30S و50S بينما يتركب الريبوسوم الكامل (80S)

فى الكائنات حقيقية النواة من وحدتين ريبوسوميتين هما 40S و60S وتحتوى الوحدة الريبوسومية 60S وكذلك الوحدة الريبوسومية 50S على موقعين أحدهما يسمـــي (Asite) Amino acyl site والآخر يسمى (P site) Peptidyl site وتبدأ عملية ترجمة الـــmRNA بإرتباط الريبوسوم (Ribosome) بخيط الـــmRNA وترجمته إلى البروتين المناسب كما سيأتى ذكره بالتفصيل فى الباب الرابع.

شكل (٢٧): يوضح خطوات حمل الحامض النووى الناقل tRNA للحامض الأميني

١ – تنشيط الحامض الأميني بالطاقة اللازمة من المركب الغنى بالطاقة ATP بواسطة إنزيم Amino acyl tRNA synthetase.

٢ – نقل الحامض الأميني المنشط Amino acyladenylic acid إلى الحامض النووى الناقل tRNA بواسطة نفس الإنزيم.

الباب الرابع

الطبيعة الكيميائية للتعبير الچينى

Chemical Nature of Gene Expression

يحدث التعبير الچينى للچينات على مرحلتين على الرغم من أن التعبير الچينى عملية ديناميكية ومستمرة على النحو التالى:

أولاً: النســخ Transcription

وهى أول خطوة فى التعبير الچينى وتتمثل فى تدفق المعلومات من الـــDNA أو نسخ التتابعات النيوكليوتيدية من الـــDNA من خلال عملية البلمرة (Polymerization) التى يقوم بها إنزيم البلمرة (RNA polymerase) وتكوين خيط الـــ RNA الرسول (mRNA) الذى يحمل التتابعات النيوكليوتيدية المكملة لتلك الموجوده فى الـــDNA مع إحلال سكر الريبوز فى الـــRNA وكذلك القاعده يوراسيل (U) بدلاً من الثيمين (T) حيث يستخدم هذا الإنزيم الخيط القالب من الـــ DNA الذى إتجاهه $3' \longrightarrow 5'$ كقالب لتكوين خيط الـــmRNA (شكل ٢٨).

وتتلخص الخصائص الكيميائية العامة للنسخ الإنزيمى للـــ DNA فيما يلى:

١- الوحدات البنائية اللازمة لتخليق خيط الـــ mRNA وهى

أ- الادينوزين ثلاثى الفوسفات (Adenosine triphosphate (ATP

ب- الجوانوزين ثلاثى الفوسفات (Guanosine triphosphate (GTP

ج- اليوريدين ثلاثى الفوسفات (Uridine triphosphate (UTP

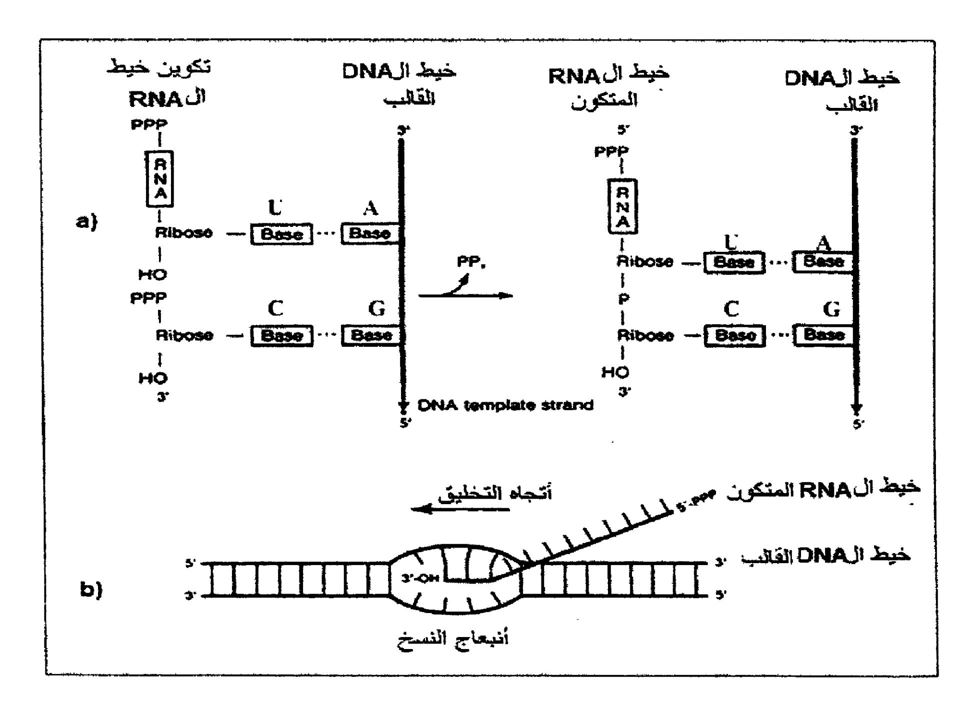
د- السيتوسين ثلاثى الفوسفات (Cytosine triphosphate (CTP

والتى تحتوى كل وحده من هذه الوحدات البنائية على سكر الريبوز (Ribose)

٢- يبدأ تكوين خيط الـــ mRNA بارتباط مجموعة الهيدروكسيل ($3'$ - OH) بالنيوكلوتيدة الأولى مع مجموعة الفوسفات ($5'$ -p) فى النيوكلوتيدة الثانية ويحدث إزالة لمجموعة الفوسفات الطرفية فى

صورة فوسفات غير عضوية (ppi) ونتيجة لذلك تتكون الرابطة الفوسفودايستر (Phosphodiester) بين النيوكليوتيدتين (شكل ٢٨).

٣- تتابع النيوكليوتيدات فى خيط الـــ mRNA يكون مكمل لتتابع النيوكليوتيدات الموجوده على خيط الـــ DNA القالب الذى إتجاهه $3' \longrightarrow 5'$ وذلك من خلال الاقتران بين النيوكليوتيدات المكملة حيث يقترن كل من اليوراسيل (U) والسيتوسين(C) فى خيط الـــmRNA المتكون بكل من الأدينين (A) والجوانين (G) فى خيط الـــ DNA القالب وكذلك يقترن الأدينين (A) والجوانين (G) فى خيط الـــ mRNA المتكون بكل من الثيمين (T) والسيتوسين (C) فى خيط ال DNA القالب.



شكل(٢٨) : تخليق الـــRNA (RNA synthesis)

a- خطوة البلمرة (Polymerization Step).

b- خيط الـــ RNA الناتج ينسخ فى الإتجاه $5' \longrightarrow 3'$ فقط من على الخيط القالب وبذلك يحتوى الطرف $3'$ على مجموعة هيدروكسيل $3'$-OH بينما يحتوى الطرف $5'$ على ثلاثة مجاميع فوسفات($5'$–ppp) .

٤- يتم إضافة النيوكليوتيدات الى الطرف $3'$ - OH فقط فى خيط الـ mRNA النامى وبذلك سوف يحتوى الطرف $5'$ من الـRNA الذى انتهى تخليقه على ثلاثة مجاميع فوسفات ($5'$ - ppp) ولذلك يسمى إتجاه تخليق خيط الـmRNA بالإتجاه $5' \longrightarrow 3'$ والذى يكون فى إتجاه معاكس لخيط الـDNA القالب والذى إتجاهه $3' \longrightarrow 5'$.

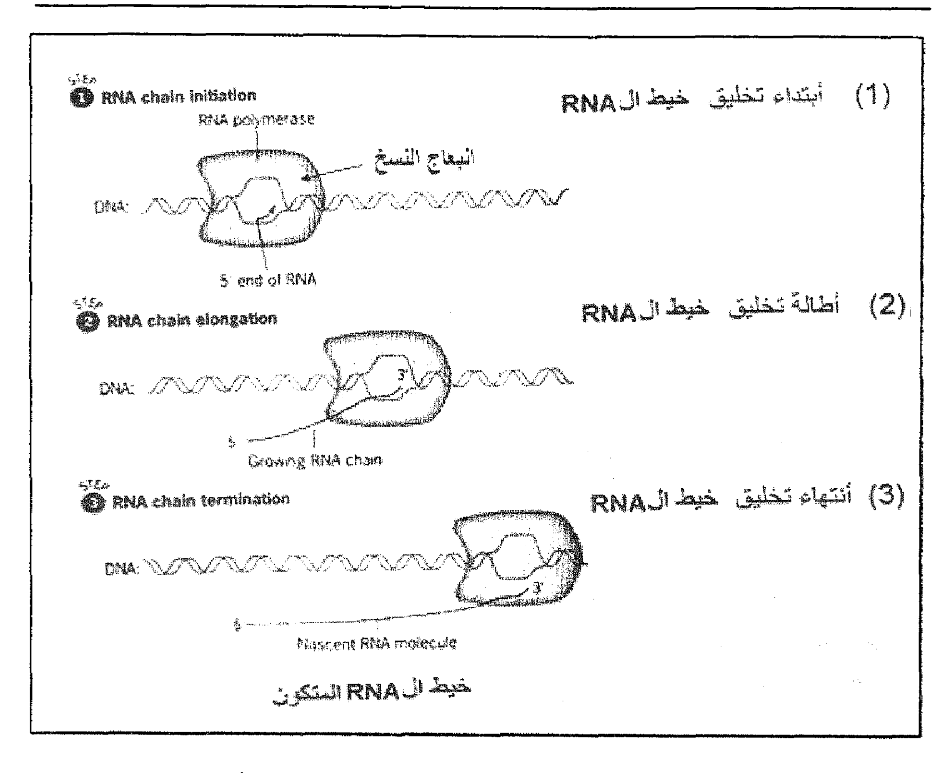
وعلى الرغم من أن عملية تخليق خيط الـmRNA أو نسخ الخيط القالب عملية ديناميكية ومستمرة إلا أنها تحدث من خلال ثلاثة مراحل على النحو التالى (شكل ٢٩) :

أ- مرحلة البداية (Initiation stage)

وفى هذه المرحلة يتعرف إنزيم البلمرة RNA polymerase على منطقة البروموتور (Promoter) عن طريق الوحدة البروتينية سجما (δ) حيث يرتبط الإنزيم الكامل (Holoenzyme) بالبروموتور ويساعد هذا الارتباط فى انفصال خيطى الـ DNA عن بعضها وتكوين انبعاج النسخ (Transcription bubble) ثم تنفصل الوحدة سجما (δ) عن باقى الإنزيم المركزى (Core enzyme) والذى يقوم بنسخ الخيط القالب حيث يقوم الإنزيم الخام بوضع أول نيوكلوتيدة فى خيط الـ mRNA النامى فى الإتجاه $5' \longrightarrow 3'$.

ب-مرحلة الإطالة (Elongation stage)

وفى هذه المرحلة يبدأ تحرك الإنزيم المركزى داخل انبعاج النسخ على طول الخيط القالب مضيفاً النيوكليوتيدات تلون الأخرى الى الطرف $3'$ - OH من خيط الـmRNA النامى بمعدل ٢٠٠ نيوكلوتيدة فى الثانية الواحدة عن طريق الاقتران بين القواعد المكملة فى كل من الخيط القالب وخيط الـmRNA النامى وتكوين الروابط الفوسفودايستر بين هذه النيوكليوتيدات ويستمر الإنزيم المركزى فى الحركة داخل انبعاج النسخ على طول الخيط القالب مضيفاً النيوكليوتيدات الى الطرف $3'$ - OH من خيط الـmRNA النامى حتى يصل الى منطقة إنتهاء النسخ فى الخيط القالب حيث يتوقف عن الاستمرار فى النسخ وإطالة خيط الـmRNA النامى. ويلاحظ أنه كلما تقدم الإنزيم المركزى داخل انبعاج النسخ يتكون الحلزون المزدوج (Double helix) مرة أخرى بين خيطى الـDNA فى الجزء الذى تم نسخه.



شكل(٢٩): يوضح مراحل النسخ (Transcriptional Stages) بواسطة إنزيم البلمرة RNA polymerase

1-مرحلة البداية (Initiation) ٢-مرحلة الإطالة (Elongation) ٣-مرحلة الإنتهاء (Termination)

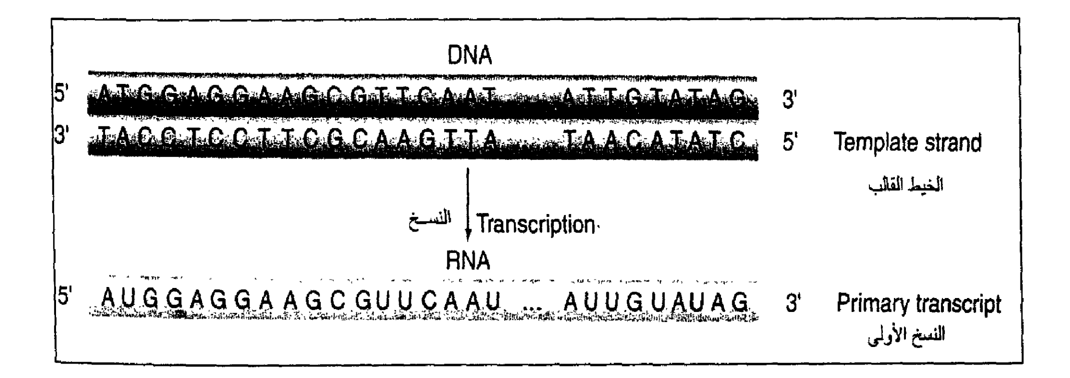
ج- مرحلة الانتهاء (Termination stage)

وفى هذه المرحلة يتوقف الإنزيم المركزى عن الاستمرار فى الحركة داخل انبعاج النسخ ويتوقف عن إضافة النيوكليوتيدات الى الطرف $3'$-OH من خيط الـ mRNA النامى وبذلك تكون قد أنتهت عملية النسخ وتكوين خيط الـmRNA كامل التكوين وعند ذلك يترك الإنزيم المركزى وكذلك خيط الـmRNA الكامل التكوين خيط الـDNA القالب بمساعدة بعض العوامل البروتينية الموجودة بالنواة.

ثم بعد ذلك يترك خيط الـــmRNA النواة (Nucleus) ويذهب الى السيتوبلازم من خلال الثقوب الموجودة فى الغلاف النووى لترجمته الى البروتين المناسب. ويلاحظ أنه بانتهاء النسخ يكون قد تم تدفق ونقل المعلومات الوراثية (التتابعات النيوكليوتيدية) الموجودة فى الخيط القالب فى صورة تتابعات نيوكلوتيدية محددة فى خـــيط الـــــmRNA يحـــددها ويمليها تلك التتابعات النيوكليوتيدية الموجودة فى الخيط القالب (شكل٣٠).

ثانياً: الترجمة (Translation)

يمكن تقسيم مراحل ترجمة الرسالة الوراثية (mRNA) الى ثلاثة مراحل وبالأخذ فى الاعتبار أن الترجمة عملية ديناميكية (Dynamic) ومستمرة فإنه يوجد عديد من العوامل البروتينية والتى لكل عامل منها دور فى عملية الترجمة (جدول ٤)



شكل(٣٠) : تدفق المعلومات من الچين خلال عملية نسخه وتكوين الـــRNA.

يتمثل تدفق المعلومات فى طبع التتابع النيكليوتيدي الموجود فى الخيط القالب الذي إتجاهه $3' \longrightarrow 5'$ إلى ذلك التتابع النيكليوتيدي المكمل فى المنسخ الأولى (Primary transcript) مع إحلال اليوراسيل (u) محل الثيمين (T) فى خيط المنسخ الأولى الذي يتم نسخه فى الإتجاه $5' \longrightarrow 3'$.

جدول(٤): يوضح العوامل البروتينية (Protein Factors) التى لا دور فى عملية الترجمة فى البكتيريا *E. coli*

العملية (Process)	العامل (Factor)	الدور (Role)
بداية الترجمة (Initiation of Translation)	IF_1 ←	يثبت الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S).
	IF_2 ←	يربط الـــfmet- RNA بالوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) والمرتبطة بالـــ mRNA.
	IF_3 ←	يربط الوحدة الريبوسومية الصغيرة بالـــmRNA وكذلك انفصال الوحدات الريبوسومية عن بعضها بعد انتهاء الترجمة.
إطالة السلسلة عديدة الببتيد (Elongation of polypeptide chain)	$EF\text{-}T_4$ ←	يرتبط بالـــGTP وإحضار الـــamino acyl – tRNA إلى الموقع A من الريبوسوم.
	$EF\text{-}T_5$ ←	يولد العامل $EF\text{-}T_4$ النشط.
	EF- G ←	يحفز عملية الانتقال GTP – dependent.
إنهاء الترجمة وتحرر السلسلة عديدة الببتيد (Termination of translation and release of polypeptide chain)	RF_1 ←	يحفز تحرر السلسلة عديدة الببتيد من الـــtRNA وانتقال مكونات الأنتقال عند شفرات الأنتهاء UAA و UAG.
	RF_2 ←	يسلك نفس سلوك RF1 وخاصة بالنسبة لشفرات الأنتهاء UAA وUAG.
	RF_3 ←	ينبه كل من العامل RF_1 وRF_2.

وسوف نتناول مراحل الترجمة على النحو التالى:

أ- مرحلة البداية (Initiation stage)

تشمل مرحلة بداية الترجمة فى الكائنات غير حقيقية النواة مثل البكتيريا على المكونات التالية (شكل ٣١) :

١- الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30 S) .

٢- جزىء الـــmRNA .

٣- الحامض النوى الناقل الأول الذى يحمل الحامض الأمينى فورمايل ميثيونين (Formyl methionine) وهو fmet – tRNA .

٤- المركب الغنى بالطاقة GTP .

٥- عديد من العوامل بداية الترجمة Initiation factors (IFs) والتى تعتبر من المكونات الأساسية للوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) وتنفصل هذه العوامل (IFs) عن الريبوسوم بمجرد ابتداء الترجمة وتتلخص خطوات بداية الترجمة فيما يلى:

١- تستدعى شفرة البداية AUG الموجوده فى الـــmRNA الـــtRNA الذى يحمل الحامض الأمينى فورمايل ميثيونين (fmet-tRNA).

٢- ترتبط الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) بعديد من عوامل البداية (IFs) والموضحة فى (جدول ٤) ودور كل منها.

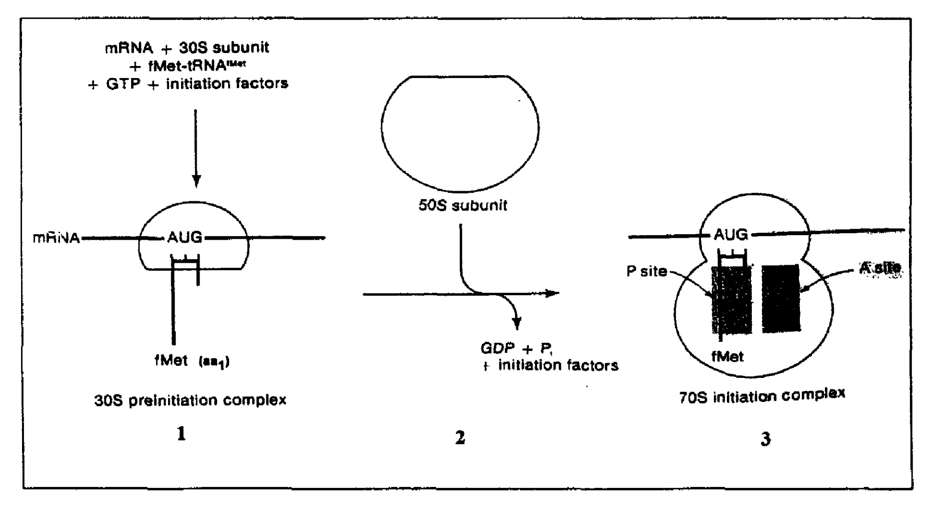
٣- ارتباط الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) بالـــmRNA يتضمن تتابع نيوكليوتيدى من ستة نيوكليوتيدات يعرف بالتتابع AGGAGG والذى يسبق شفرة البداية AUG من الـــmRNA ويسمى هذا التتابع النيوكليوتيدى باسم تتابع شاين دالجارنو (Shine-Dalgarno sequence) والذى يمثل القواعد التى تقترن بالطرف $3^{/}$ من الـــ16SrRNA الموجود فى الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) مما يسهل من عملية الترجمة كذلك يعزز العامل البروتينى IF2 ارتباط الحامض النووى الناقل fmet-tRNA والمحمل بالحامض الأمينى فورمايل ميثيونين بالوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) إستجابة لشفرة البداية AUG. وهذه الخطوة تجعل القالب الشفرى فى الـــmRNA يحدث له ترجمة فى غاية الدقة لكل الشفرات (Codons) وعند هذه اللحظة ترتبط الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) بالوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) لتكوين

الريبوسوم الكامل (70S) والطاقة التى تحتاجها هذه العملية تؤخذ من المركب الغنى بالطاقة GTP وبعد ذلك يحدث تحرر لكل عوامل بداية الترجمة (IFs) من على الريبوسوم.

ب- مرحلة الإطالة (Elongation stage)

هى الخطوه الثانية من عملية الترجمة حيث أنه بمجرد أن يتكون الريبوسوم الكامل (70S) وارتباطه بالـــmRNA يتكون موقعين من الريبوسوم هما الموقع P (Peptidyl site) والموقعA (Amino acyl site) وتتلخص خطوات مرحلة الاطالة (Elongation) فى الخطوات التالية:

١- ارتباط أول حامض نووى ناقل tRNA والمحمل بأول حامض أمينى بالموقع P من الريبوسوم عند شفرة البداية AUG من الـــmRNA.



شكل(٣١) : يوضح مراحل بداية الترجمة (Initiation of translation) وهى:

١- ارتباط الـ mRNA بالوحدة الريبوسومية الصغيرة بمساعدة عوامل البداية IF_3, IF_2, IF_1.

٢- ارتباط الحامض النووى الناقل الذى يحمل الحامض الأمينى فورمايل ميثيونين tRNA f met بالـــmRNA عند شفرة بداية الترجمة AUG فى الموقع P من الريبوسوم وتحرر عامل البداية IF_3.

٣- ارتباط الوحدة البروتينية الكبيرة بالوحدة الصغيرة وتكوين الريبوسوم الكامل (70S) وتحرر كل من عامل البداية IF_2, IF_1 , وارتباط عامل الاطالة EF-Tu بالـــtRNA مسهلاً الطاقة للموقع A من الريبوسوم.

٢- تزداد طول السلسلة عديدة الببتيد فى الطول بإضافة الأحماض الأمينية الى السلسلة عديده الببتيد حيث تحدد الشفرة (Codon) الثانية من الــmRNA دخول الــtRNA المحمل بالحامض الأمينى الثانـــى فى الموقع A من الريبوســـوم (شكل ٣٢) وبمجرد حدوث ذلك يقوم إنزيم Peptidyl transferase بتكوين الرابطة الببتيدية بين الحامض الأمينى الأول والثانى ويحفز نشاط هذا الإنزيم الحامض النووى الريبوسومى 23SrRNA الموجود فى الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) وفى نفس الوقت تنكسر الرابطة بين الحامض الأمينى والــtRNA الحامل له والموجود فى الموقع P من الريبوسوم ونتيجة لذلك يتصل الحامضين الأمينين بالطرف $3'$ من الــtRNA والذى مازال موجوداً بالموقع A من الريبوسوم.

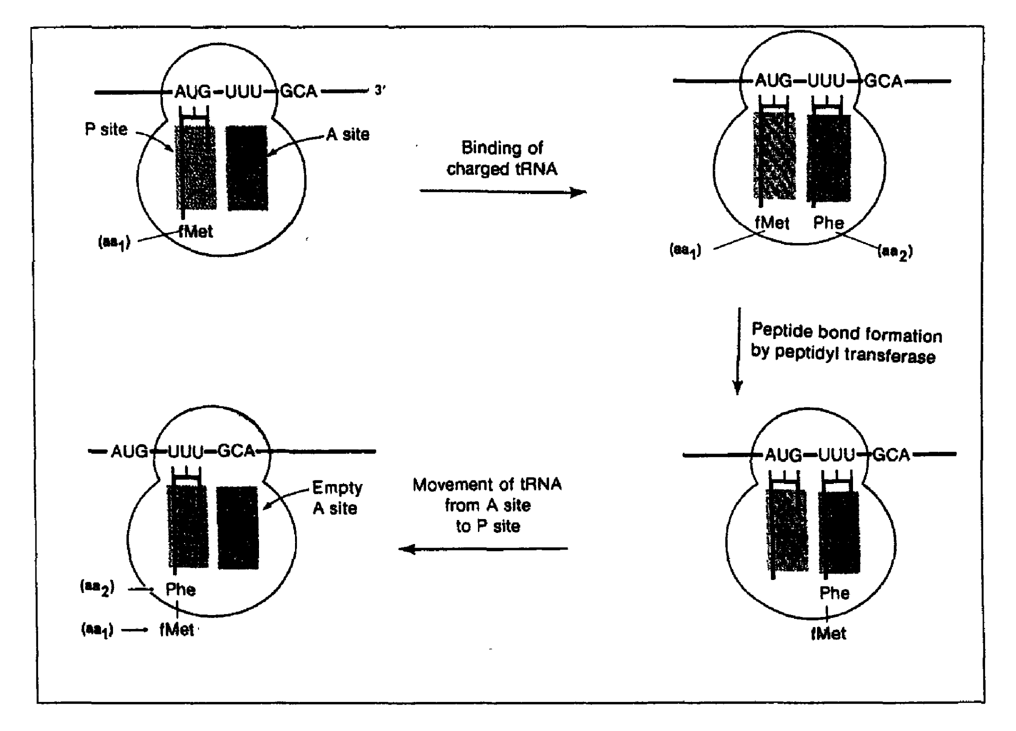
٣- قبل أن تتكرر عملية الإطالة فإن الــtRNA الموجود بالموقع P يصبح غير محمل باى حامض أمينى وبالتالى يجب أن يترك الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) ولذلك فإنه ينتقل مؤقتاً الى موقع ثالث من الريبوسوم يعرف باسم E site ليترك الريبوسوم بعد ذلك.

٤- ينتقل المركب المكون من الــmRNA والــtRNA الذى يحمل الحامض الامينى الاول aa_1 والثانى aa_2 ($mRNA$-$tRNA$-aa_2-aa_1) الى الموقع P بمسافة مقدارها شفرة (Codon) واحده أخرى وتحتاج هذه الخطوة الى عديد من عوامل الإطالة (جدول ٤) وكذلك الطاقة اللازمة لذلك يقدمها المركب الغنى بالطاقة GTP ونتيجة لذلك تصبح الشفرة الثالثة من الــmRNA فى الموقع P من الريبوسوم الذى سوف يستقبل الحامض النووى الناقل الثالث tRNA والمحمل بالحماض الأمينى الثالث وعلى ذلك يلاحظ أنه فى كل حركة للــmRNA مقدارها شفرة واحدة فإن الموقع P من الريبوسوم يحتوى على الــtRNA المحمل بالسلسلة عديدة الببتيد بينما يكون الموقع A محتوياً على الــtRNA المحمل بالحامض الأمينى الجديد.

٥- تتكرر عملية الإطالة التى يحدث فيها إضافة لأحد الأحماض الأمينية للسلسلة عديدة الببتيد فى كل خطوة يتحرك فيها الــmRNA حركة مقدارها شفرة واحدة خلال الريبوسوم.

٦- بمجرد أن تتكون السلسلة عديدة الببتيد بالطول المناسب يحدث لها غمر لقاعدة الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) من خلال النفق (Tunnel) الموجود داخل الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) .

٧- دور الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) أثناء عملية الاطالة هو قراءة الشفرات بينما يكون دور الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) هو تكوين وتخليق الروابط الببتيدية وهذه العملية تتم بكفاءة عالية والخطأ المشاهد فى هذه العملية هو خطأ واحد لكل ١٠[٤] عملية اطالة بمعنى أنه يحدث ادخال خطأ لحامض أمينى مرة واحده لكل ٢٠ سلسلة عديدة الببتيد طول كل سلسله منها ٥٠٠ حامض أمينى. وتحدث عملية الإطالة فى البكتيريا *E. coli* تحت درجة حرارة ٣٧°م بمعدل ادخال ١٥ حامض فى السلسلة عديدة الببتيد فى الثانية الواحدة.



شكل (٣٢) :يوضح مراحل الاطالة(Elongation stages)

١- دخول ثانى tRNA المحمل بثانى حامض أمينى aa_2 الموقع A من الريبوسوم وبذلك تبدأ أول خطوة فى الاطالة.

٢- تكوين الرابطة الببتيدية وتحرك tRNA الخالى من الحامض الأمينى الى الموقع E من الريبوسوم ثم بعد ذلك الى خارج الريبوسوم ثم يتحرك الـmRNA تجاه الشمال بمقدار شفرة ثلاثية ويؤدى ذلك الى انتقال الـtRNA المحمل بالحامض الامينى الاول aa_1 والحامض الامينى الثانى aa_2 الى الموقع P من الريبوسوم.

ج- مرحلة الانتهاء (Termination stage)

هذه المرحلة هى ثالث خطوة فى عملية الترجمة حيث ينتهى تخليق البروتين عند شفرة أو أكثر من شفرة من شفرات إنهاء الترجمة الموجودة بالموقع A من الريبوسوم (UAG أو UAA أو UGA) وذلك لأن هذه الشفرات ليست خاصة باى حامض أمينى وبالتالى فإنها لا تستدعى اى حامض نووى ناقل tRNA الى الموقع A من الريبوسوم وهذه الشفرات تسمى شفرات إنهاء الترجمة أو شفرات التوقف أو الشفرات التى ليس لها معنى وعند ذلك فإن السلسلة عديدة الببتيد المتكونة بالكامل تظل متصلة بآخر حامض نووى ناقل tRNA والموجود فى الموقع P من الريبوسوم وبذلك يصبح الموقع A من الريبوسوم شاغراً أو فارغاً. وتنشط عوامل انتهاء الترجمة (GTP-dependent termination) انفصال جميع مكونات عملية الترجمة عن بعضها، وبمجرد أن يحدث هذا الانفصال يترك الـــ tRNA الريبوسوم ثم تنفصل مكونات الريبوسوم الكامل (70S) الى الوحدة الريبوسومية 30S و الوحدة الريبوسومية (50S) مرة أخرى. وإذا ظهرت شفرة من شفرات إنهاء الترجمة فى وسط الـــ mRNA نتيجة لحدوث طفرة فسوف تحدث نفس الخطوات ولكن تنتج سلسلة عديدة الببتيد غير كاملة التكوين.

عديد الريبوسومات (Polyribosomes)

عندما تتقدم اطالة السلسلة عديدة الببتيد يتحرك الجزء الأول من الـــmRNA خلال الريبوسوم وبالتالى يصبح هذا الطرف من الـــmRNA حر فى ان يرتبط به الوحدة الريبوسومية الصغيره (30S) لتمثل بداية جديدة آخرى لعملية الترجمة وهذه العملية قد تتكرر عديد من المرات على نفس الـــmRNA مكونة ما يعرف بعديد الريبوسومات (Polyribosomes) أو (Polysomes) والتى تم عزلها وتحليلها من خلال المعاملة الهادئه والدقيقة للخلايا. وتكوين عديد الريبوسومات يمثل كفاءة استخدام مكونات الترجمة المتاحة لتخليق البروتين فى وحدة الزمن ولكنه عند أى وقت ما أثناء التخليق الحيوى للبروتين يتكون عديد من السلاسل عديدة الببتيد ذات الأطوال المختلفة. وعلى الرغم من أن آلية التعبير الجينى هى نفس الآلية فى كل من الكائنات

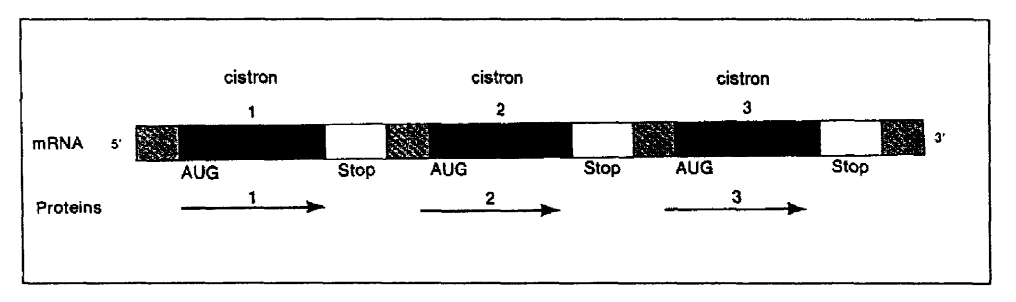
حقيقية النواة والكائنات غير حقيقية النواة إلا أنه توجد بعض الاختلافات الجوهرية فى عملية الترجمة نوجزها فيما يلى:

١- فى الكائنات غير حقيقية النواة تبدأ عملية الترجمة وتخليق السلسلة عديدة الببتيد بالحامض الأمينى فورمايل ميثيونين والذى يحمله الحامض النووى الناقل (fmet-tRNA) تمييزاً له عن الحامض النووى الذى يحمل الحامض الأمينى ميثيونين Methinine (met tRNA) وكلاهما يتعرف على شفرة البداية AUG وعندما توجد هذه الشفرة AUG فى بداية الرسالة mRNA فإنه يتم وضع الحامض الأمينى فورمايل ميثيونين بواسطة الـ fmet-tRNA ولكن أذا وجدت هذه الشفرة (AUG) داخل الرسالة الوراثية (mRNA) فإنه يتم وضع الحامض الأمينى ميثيونين بواسطة الـ met-tRNA ، بينما فى الكائنات حقيقية النواة تبدأ الترجمة بالحامض الأمينى ميثيونين الذى يحمله الحامض النووى الناقل met-tRNA .

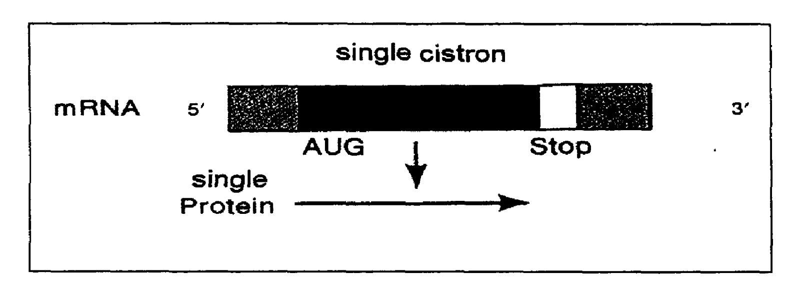
٢- يبدأ تخليق السلسلة عديدة الببتيد فى الكائنات غير حقيقية النواة بارتباط الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) بالـmRNA عند شفرة البداية كما سبق ذكره وليس بارتباط الريبوسوم الكامل (70S) بينما فى الكائنات حقيقية النواة يرتبط الريبوسوم الكامل (80S) بالطرف $5'$ من الـ mRNA ثم يتحرك على طول الـmRNA حتى يصل الى شفرة البداية AUG والقريبة جداً من الطرف $5'$ من الـmRNA.

٣- فى الكائنات غير حقيقية النواة يحمل الـmRNA الشفرات اللازمة للتعبير عن عديد من أنواع السلاسل عديدة الببتيد المختلفة ولذلك يسمى باسم الـmRNA المتعدد السسترونات (Polycistronic mRNA) وذلك خلال نسخه لمجموعة من الجينات (السسترونات) المتجاورة والتى تعطى أنواع مختلفة من السلاسل عديدة الببتيد وعلى ذلك فإن هذا الـ mRNA المتعدد السسترونات يجب أن يحتوى على عديد من شفرات البداية (AUG) وعديد من شفرات إنهاء الترجمة (شكل٣٣) بينما فى الكائنات حقيقية النواة يحمل الـmRNA الناضج (Mature mRNA) الشفرات اللازمة لتخليق نوع واحد من السلاسل عديدة الببتيد وبذلك يسمى بالـmRNA أحادى السسترون (Monocistronic mRNA) وعلى ذلك فإنه سوف يحتوى على شفرة بداية AUG واحده وشفرة إنهاء الترجمة واحده (شكل ٣٤).

٤- فى الكائنات غير حقيقية النواة لا توجد نواة (Nucleus) بالخلية وبذلك تحدث كل من عملية النسخ وعملية الترجمة فى نفس الجزء من الستوبلازم وبذلك فإنه غالباً فى نفس الوقت الذى يحدث فيه نسخ الخيط القالب وتكوين خيط الـــmRNA يحدث له ترجمة بواسطة الريبوسومات وقبل أن ينتهى نسخ الـــmRNA بالكامل. بينما فى الكائنات حقيقية النواة تحدث عملية النسخ داخل النواة بينما تحدث عملية الترجمة بالسيتوبلازم وبالتالى لا يحدث تداخل بينهما.



شكل (٣٣): يوضح جزئ الـــmRNA فى الكائنات غير حقيقية النواة والذى يحمل الشفرات اللازمة لإنتاج عديد من أنواع البروتينات polycistronic mRNA وبالتالى فإنه يحتوى على عديد من شفرات بداية الترجمة AUG وعديد من شفرات إنهاء الترجمة (Stop codon) لإنتاج الأنواع المختلفة من البروتينات عند ترجمته بريبوسومات الكائنات غير حقيقية النواة.



شكل (٣٤): يوضح جزئ الـ mRNA الناضج فى الكائنات حقيقية النواة والذى يحمل الشفرات (Codons) اللازمة لتخليق نوع واحد من البروتينات ويسمى بالـــmonocistronic mRNA حيث يحتوى على شفرة واحده لبداية الترجمة AUG وشفرة واحده لتوقف الترجمة(Stop codon) وذلك من خلال ترجمته بريبوسومات الكائنات حقيقية النواة.

الباب الخامس

تنظيم التعبير الچينى فى الكائنات غير حقيقية النواة

Regulation of Gene Expression In Prokaryotes

مما سبق أصبح من المؤكد معرفة كيفية تواجد الچينات فى الـــ DNA والكيفية التى تخزن بها الچينات المعلومات الوراثية فضلاً عن الكيفية التى يتم بها التعبير الچينى لهذه الچينات وفيما يلى سوف نتناول أكثر الأساسيات جدلاً فى الوراثة الجزيئية(Molecular genetics) وهى كيفية تنظيم التعبير الچينى ، ومع ذلك فإن فكرة أن الچينات يمكنها أن تعمل (Turned on) أو تتوقف عن العمل (Turned off) هى أكثر اقناعاً. ولقد أوضح التحليل التفصيلى للبروتينات فى البكتيريا *E. coli* على سبيل المثال اختلاف تركيزات ٤٠٠٠ نوع أو أكثر من السلاسل عديدة الببتيد والتى توجد شفراتها على الچينات اختلافاً كبيراً. فبعض البروتينات قد توجد فى صورة عدد قليل من الجزيئات فيما بين ٥ إلى ١٠ جزيئات بروتينية للخلية الواحدة بينما بعض البروتينات الأخرى مثل البروتينات الريبوسومية وكثير من البروتينات التى لها دور فى الممرات الحيوية توجد بكميات ضخمة وكبيرة تصل إلى ١٠٠ الف نسخة من كل بروتين من هذه البروتينات لكل خلية. وعلى ذلك فإن معظم نواتج الچينات فى الكائنات غير حقيقية النواة تتواجد بصورة مستمرة عند مستوى أساسى (Basal level) فى صورة عدد قليل من النسخ البروتينية وأن هذا المستوى من التركيز يتزايد بصورة مفاجئة. ومن ثم يبدو واضحاً أنه يجب أن تتواجد آليات أساسية للتحكم فى التعبير الچينى. وفى هذا الباب سوف نلقى الضوء على ما نعرفه حول تنظيم التعبير الچينى فى البكتيريا.

وتعتبر البكتيريا من الكائنات الممتازة فى الدراسات البحثية المتعددة فى مجال الوراثة الجزيئية بصفة خاصة وفى مجال الوراثة بصفة عامة وذلك للأسباب الآتية:

١- أن دورة تكاثرها قصيرة.

٢- أنها تتكاثر لمئات من الأجيال منتجاً ملايين من الخلايا البكتيرية المتماثلة والمتطابقة وراثياً خلال ليلة من نموها وتكاثرها على البيئة الغذائية.

٣- سهولة استحداث الطفرات وعزلها الناتجة من خلية بكتيرية مفردة ودراستها بصورة مستقلة.

وبالعودة إلى موضوعنا الحالى فإن البكتيريا أيضاً تعتبر نظام نموذجى ممتاز بالنسبة للدراسات التى تتضمن أستحثاث أو تحفيز (Induction) النسخ الوراثى بالإستجابة للتغير فى الظروف البيئية. وسوف نركز أهتمامنا على تنظيم التعبير الچينى عند مستوى نسخ الچين ويجب أن نضع فى اعتبارنا أيضاً أنه يحدث تنظيم للتعبير الچينى ما بعد عملية نسخ الچين (Posttranscriptional regulation).

الآليات الوراثية فى الكائنات غير حقيقية النواة استجابة للظروف البيئية

Genetic mechanisms to respond to environmental condition in prokaryotes

تم دراسة تنظيم التعبير الچينى بصورة مكثفة فى الكائنات غير حقيقية النواة وخاصة البكتيريا *E.coli*. ومن المعروف وجود آليات وراثية ذات كفاءة عالية تتضمن أن تجعل الچينات تعمل أو تتوقف عن العمل معتمداً ذلك على إحتياجات الخلية الميتابولزمية لناتج چين معين. وهذا التنظيم فى التعبير الچينى لا يجعل البكتيريا تستجيب إلى التغيرات فى الظروف البيئية فقط ولكنه يمتد أيضاً إلى تنظيم تضاعف وإصلاح (Repair) الــDNA وكذلك الانقسام الخلوى والنمو فى البكتيريا.

وفكرة ان الكائنات الدقيقة (Microorganisms) تنظم تعبيرها الچينى ليست فكرة جديدة، ففى بداية القرن العشرين لــوحظ أنــه عــندما يــوجد ســكر الــلاكتوز(Lactose) (سكر ثنائى يتركب من الجلوكوز والجالكتوز) فى البيئة الغذائية للبكتيريا فإنها تقوم بإنتاج الإنزيمات اللازمة لميتابولزم سكر اللاكتوز وعند غياب هذا السكر من البيئة لا يحدث إنتاج لهذه الإنزيمات. وبعد ذلك وسريعاً استطاع الباحثين استنباط فكرة تأقلم البكتيريا للظروف البيئية من خلال إنتاجها لإنزيمات معينة فقط عند تواجد مادة تفاعلها فى البيئة ومثل هذه الإنزيمات سميت باسم الإنزيمات المتأقلمة (Adaptive enzymes) . وعلى العكس من ذلك فإن الإنزيمات التى تنتج بصورة مستمرة بغض النظر عن وجود مادة تفاعلها فى البيئة الغذائية سميت الإنزيمات التى تنتج بصورة مستمرة (Constitutive enzymes) . ومنذ ذلك الحين يستخدم اصطلاح الإنزيمات المحثه أو المحفزه (Inducible enzymes) بصورة أكثر دقة عن اصطلاح الإنزيمات المتأقلمة والذى يعكس دور المحفز (Inducer) فى إنتاج الإنزيمات ولقد أوضحت الأبحاث الحديثة أيضاً وجود نظام عكس النظام السابق حيث أن وجود جزيء معين يكبت التعبير الچينى وهذا عادة ما يكون حقيقى بالنسبة للجزيئات التى تمثل الناتج النهائى لممر تخليقى حيوى فعلى سبيل المثال فان الحامض الامينى التربتوفان (Tryptophan) يمكن تخليقه بواسطة الخلايا البكتيرية وإذا وجدت كميات كافية منه فى البيئة الغذائية يصبح إهدار لطاقة الخلية البكتيرية فى إنتاج الإنزيمات الضرورية لتخليق هذا الحامض الامينى. ولذلك وضعت آلية أو ميكانيزم يكون للتربتوفان دور فى كبت (Repressing) نسخ الــmRNA الضرورى لإنتاج الإنزيمات المناسبة للممر التخليقى الحيوى وعلى العكس من النظام التحفيزى (Inducible system) الذى يتحكم فى ميتابولزم سكر اللاكتوز فان النظام الذى يتحكم فى إنتاج التربتوفان يسمى بالنظام الكبتى (Repressible system) .

وتنظيم التعبير الچينى سواء فى النظام التحفيزى أو الكبتى إما أن يكون تحكم موجب أو تحكم سالب. وفى التحكم السالب يحدث التعبير الچينى ما لم يحدث له غلق (Shut off) بواسطة جزىء منظم (Regulator molecule). وعلى العكس من ذلك فان التحكم الموجب يجب أن يحدث التعبير الچينى أو تحدث عملية النسخ فقط إذا قام الجزيء المنظم مباشرة بتنبيه إنتاج

الــmRNA . ومن الناحية النظرية فإن كلا الطرازين من التحكم الموجب والسالب يتم بواسطة النظام التحفيزى أو النظام الكبتى. وسوف نناقش فيما يلى هذه الأنظمة من تنظيم التعبير الچينى بالنسبة للإنزيمات التى لها دور فى ميتابولزم سكر اللاكتوز والحامض الأمينى التربتوفان.

أولاً: النظام التحفيزى Inducible system

فى بداية عام ١٩٤٦ ومن الدراسات والأبحاث التى أجراها العالم Jacques Monod والتى استمرت حتى العقد التالي بواسطة العلماء Joshua Lederberg, Francais Jacob, Andre L. Wolf تجمعت الأدلة الوراثية والبيوكيميائية لميتابولزم سكر اللاكتوز. وهذه الأدلة قدمت الطريقة التي يكبت بها (Repressed) النشاط الچيني عندما لا يوجد سكر اللاكتوز في البيئة وتحفيزه (Induced) عندما يكون سكر اللاكتوز متاحا في البيئة الغذائية. ففي وجود سكر اللاكتوز فان تركيز الإنزيمات المسئولة عن ميتابوليزم سكر اللاكتوز تتزايد بسرعة من عدد قليل من الجزيئات الي آلاف من الجزيئات لكل خلية. وعلي ذلك فان الإنزيمات المسئولة عن ميتابولزم سكر اللاكتوز حدث لها تحفيز وان سكر اللاكتوز يعمل كمحفز (Inducer) .

وفي الكائنات غير حقيقية النواة تكون الچينات التي تنتج مجموعة من الإنزيمات التي تشترك في نفس الممر التخليقى الحيوي او الهدمي متجمعة مثل الچينات التي تنتج إنزيمات ميتابولزم سكر اللاكتوز وان هذه الچينات غالبا ما يحدث لها تنظيم لتعبيرها الچيني بصورة مشتركة فى صورة وحدة تنظيمية واحدة وغالباً ما يكون موقع الوحدة التنظيمية قبل الچينات المتجمعة التى تنظم تعبيرها الچينى وتحدد تفاعلات هذا الموقع المنظم ما إذا كانت الچينات يحدث لها تعبير چينى وبالتالى ستوجد الإنزيمات أو البروتينات التى تنتجها هذه الچينات أو لا يحدث لها تعبير چينى ومن ثم لا تنتج الإنزيمات أو البروتينات. واكتشاف الچين المنظم (Regulator gene) كان له من الأهمية لكى نفهم كيف يحدث التحكم فى التعبير الچينى. وهذه الچينات المنظمة لا تحمل الشفرات اللازمة والضرورية لميتابولزم سكر اللاكتوز والتى هى وظيفة الچينات التركيبية (Structural genes) التى تشكل بالإضافة إلى الچينات المنظمة المجاورة ما يعرف بنظام الاوبرون (Operon system) والتى منها ابرون اللاكتوز (Lactose operon)

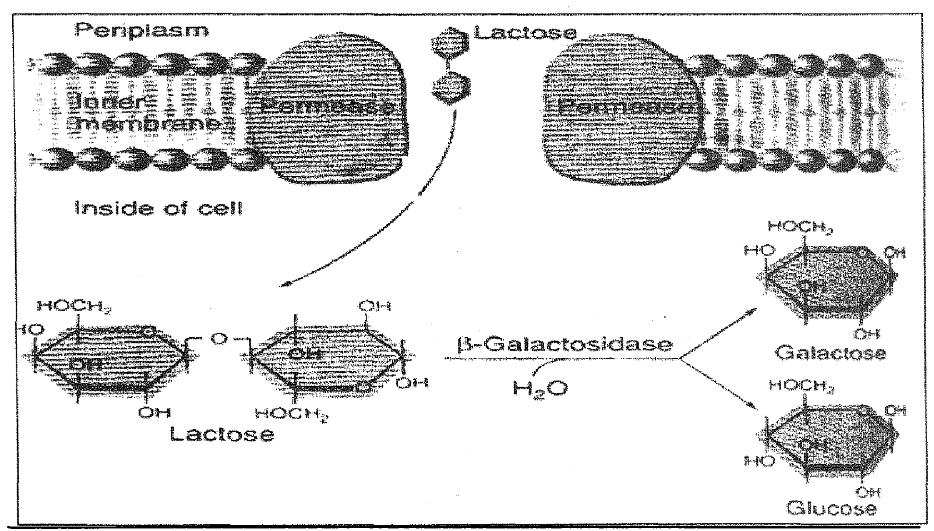
الچينات التركيبية Structural Genes

تسمى الچينات التى تحمل شفرات الإنزيمات بالچينات التركيبية ويوجد ثلاثة چينات تركيبية فى اوبرون اللاكتوز (Lac operon) وهى:

١- الچين *lac z* والذى يحمل شفرات إنزيم β-galactosidase ودوره الرئيسى هو تحويل سكر اللاكتوز الثنائى إلى سكر الجلوكوز (Glucose) وسكر الجالكتوز(Galalctose) وهذا التحول يعتبر ضرورياً إذا كان اللاكتوز هو المصدر الوحيد للطاقة فى البيئة الغذائية

٢- الچين *lac y* الذى يحمل شفرات إنزيم الـــبرميز(Permease) الذى يسهل دخول سكر اللاكتوز إلى داخل الخلية البكتيرية (شكل ٣٥).

٣- الچين *lac A* الذى يحمل شفرات إنزيم Transacetylase ودوره الفسيولوچى مازال غير واضحاً تماماً وربما يكون له دور فى إزالة النواتج السامة الناتجة من تكسير سكر اللاكتوز من الخلية.

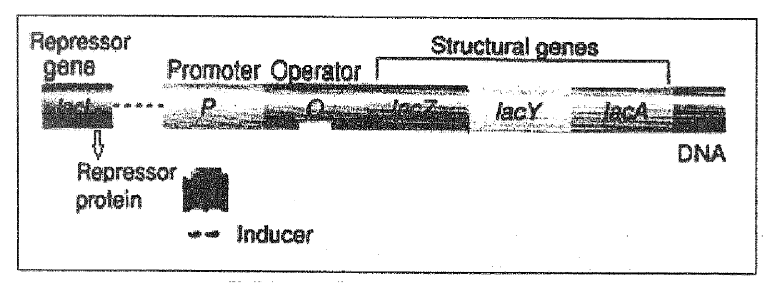


شكل (٣٥): يوضح دخول سكر اللاكتوز (Lactose) من الجدار الخلوى بمساعدة إنزيم البرميز (Permease) وداخل الخلية البكتيرية يحدث تكسيره بواسطة إنزيم β-galactosidase إلى سكر الجلوكوز (Glucose) وسكر الجالكتوز (Galactose) .

نموذج الاوبرون: التحكم السالب

The Operon Model: Negative Control

فى الستينات من القرن العشرين وضع كل من العالمين Monod وJacob نموذج الاوبرون (Operon model) والذى فيه يحدث تنظيم التعبير الچينى لمجموعة من الچينات والتى يظهر تعبيرها الچينى معاً كوحده تعبيرية واحده كما هو مشاهد فى ابرون اللاكتوز(شكل٣٦) .



شكل (٣٦): يوضح مكونات أوبروت اللاكتوز lactose operon وهى:

١-الچين الكابت (lac I) Repressor gene *lacI* .　　٢-البروموتور (P) Promoter *P* .

٣-الأوبريتور(O) Operator *O* .

٤-الچينات التركيبية structural genes وهى الچينات *lac A, lac Y, lac Z*.

٥-البروتين الكابت Repressor protein .　　٦-المحفز Inducer.

يتركب اوبرون اللاكتوز من الچينات التركيبية الثلاثة *A, Y, Z* وكذلك موقع الاوبريتور (Operater) والبروموتور (Promoter) وأقترحا أن الچين الكابت lac I ينظم نسخ الچينات التركيبية عن طريق إنتاجه لبروتين كابت (Repressor) وانه ذو خاصية allosteric والتى تعنى أنه له القدرة على التفاعل مع جزيء آخر مسبباً تغيراً فى نشاطه الكيميائى ويوضح شكل (٣٧) مكونات اوبرون اللاكتوز وكذلك تفاعل الچين الكابت lac I فى وجود وغياب سكر اللاكتوز.

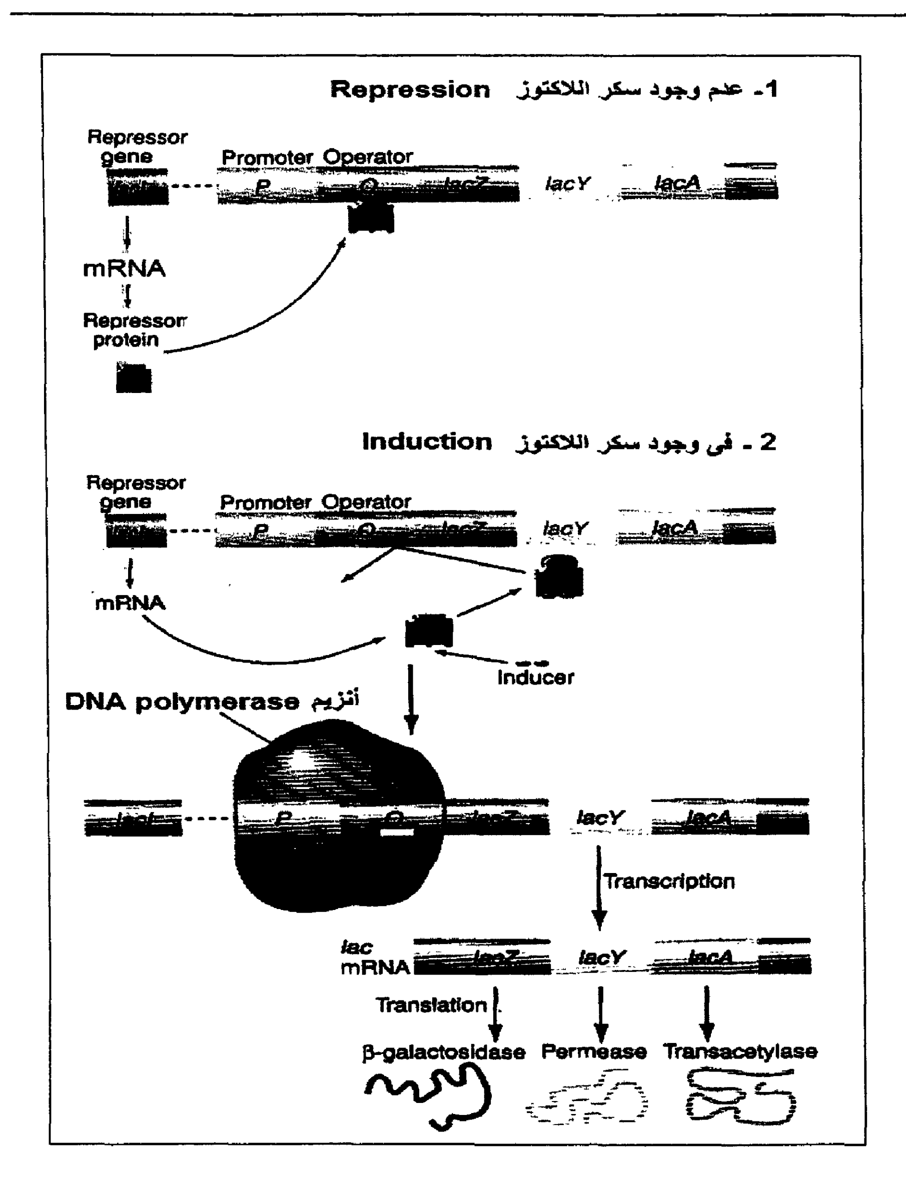
ولقد أقترحا أيضاً ان البروتين الكابت (Repressor protein) الذى ينتجه الچين الكابت lac I يتفاعل بطريقة طبيعية بمنطقة منظمة أخرى تعرف بمنطقة الاوبريتور (Operator) وعندما يحدث ذلك فإنه يثبط تفاعل إنزيم البلمرة RNA polymeraseII وبالتالى كبت نسخ الچينات التركيبية (شكل ٣٧) ومع ذلك عندما يتواجد سكر اللاكتوز فى البيئة الغذائية فإن هذا السكر يرتبط بالبروتين الكابت مسبباً حدوث تغيراً فى شكله ووظيفته والذى يؤدى بدوره لفقد مقدرته الإرتباطية بموقع الاوبريتور (O) وبالتالى يستطيع إنزيم البلمرة RNA polymeraseII نسخ الچينات التركيبية ومن ثم تنتج الإنزيمات اللازمة والضرورية لميتابولزم سكر اللاكتوز(شكل ٣٧). ونظراً لأن نسخ الچينات التركيبية يحدث فقط عندما يفشل البروتين الكابت فى الارتباط بموقع الاوبريتور (Operator) فإن هذا النظام من تنظيم التعبير الچينى يكون تحت التحكم السالب (Negative control).

ونموذج الاوبرون (Operon model) يستخدم التفاعلات الكيميائية الكامنة لتفسير كفاءة تنظيم التعبير الچينى للچينات التركيبية. ففى غياب سكر اللاكتوز لا تكون هناك حاجة للإنزيمات اللازمة لميتابولزم سكر اللاكتوز وبالتالى يحدث لها كبت (Repressed) وعندما يتواجد سكر اللاكتوز فإنه يقوم بطريقة غير مباشرة بتحفيز (Induces) نسخ الچينات عن طريق إرتباطه بالبروتين الكابت وإذا حدث ميتابولزم لكل جزيئات سكر اللاكتوز فلن توجد جزيئات منه متاحه لكى ترتبط بالبروتين الكابت والذى يصبح مرة أخرى بصورة حره تجعله قادراً على الأرتباط بموقع الاوبريتور وبالتالى يكبت نسخ الچينات التركيبية.

عزل الكابت Isolation of Repressor

على الرغم من أن نظرية الاوبرون (Operon theory) التى وضعها العالمين چاكوب (Jacob) ومونود (Monod) نجحت فى تفسير عديد من الآراء المتعلقة بتنظيم التعبير الچينى فى الكائنات غير حقيقية النواة إلا أن طبيعة الجزىء الكابت لم تكن معروفة عندما نشر هذين العالمين بحثهم المتعلق بنظرية الاوبرون ومع ذلك أفترضا أن هذا الكابت هو بروتين ما وكذلك كان الــRNA مرشحاً لكى يكون هو الكابت لأن نشاط هذا الجزىء يحتاج إلى إرتباطه بالــDNA.

وعلى الرغم من المحاولات العديدة التى أجريت لعزل وتحديد خواص هذا الجزىء الكابت الافتراضى فإنه لم تنجح هذه المحاولات البحثية فى الحصول على دليل كيميائى مباشر عن طبيعة هذا الجزىء. فالخلية البكتيرية الواحدة من البكتيريا *E. coli* لا تحتوى على أكثر من عشرة جزيئات من هذا الكابت وبذلك فإن التعيين والتحديد الكيميائى المباشر لعشرة جزيئات فى عشيرة مكونة من ملايين من البروتينات والـــRNA الموجودة فى الخلية البكتيرية الواحده يمثل صعوبة فائقة. ومع ذلك استطاع العالمان Hill و Miller عام ١٩٦٦عزل هذا الكابت الخاص باوبرون اللاكتوز فى صورة شبه نقيه باستخدامهم لسلالة طفرية من البكتيريا *E. coli* تنتج كميات كبيرة من هذا الكابت تعادل عشرة أضعاف الكمية الموجوده فى خلايا الطراز البرى من البكتيريا *E. coli* ووجدا أن هذا الكابت له عديد من الخصائص الموجوده فى البروتينات وفى عام ١٩٩٦ نجح العالمين Lewis و Ponzylu من تحديد التركيب البلورى (Crystal structure) للكابت الخاص بابرون اللاكتوز وبالإضافة إلى حقيقة كونه بروتين استطاع هذين العالمين تحديد طبيعة إرتباط هذا البروتين الكابت بكل من المحفز وبالاوبريتور ، وبذلك أكتملت صورة تنظيم التعبير الچينى للچينات عن طريق نظرية الاوبرون حيث أصبح من المؤكد أن هذا البروتين الكابت (Repressor protein) هو ناتج الچين الكابت (Repressor I gene) والذى هو عباره عن سلسلة عديدة الببتيد تتركب من ٣٦٠ حامض أمينى وأمكن تحديد موقع إرتباط المحفز بهذه السلسلة عديدة الببتيد وكذلك موقع إرتباطها بالاوبريتور والبروتين الفعلا وظيفياً من هذا البروتين الكابت يتركب من أربعة وحدات بروتينية متماثله (Homotetamer).



شكل (٣٧) : يوضح تنظيم التعبير الچيني لچينات اوبرون اللاكتوز (Lactose operon)

شرح شكل (٣٧)

١- فى حالة عدم وجود سكر اللاكتوز ينتج الچين الكابت lac I البروتين الكابت والذي يرتبط بالاوبريتور (O) وبالتالى لا يحدث نسخ للچينات التركيبية ومن ثم لا تتكون الإنزيمات الثلاثة الضرورية لميتابولزم سكر اللاكتوز.

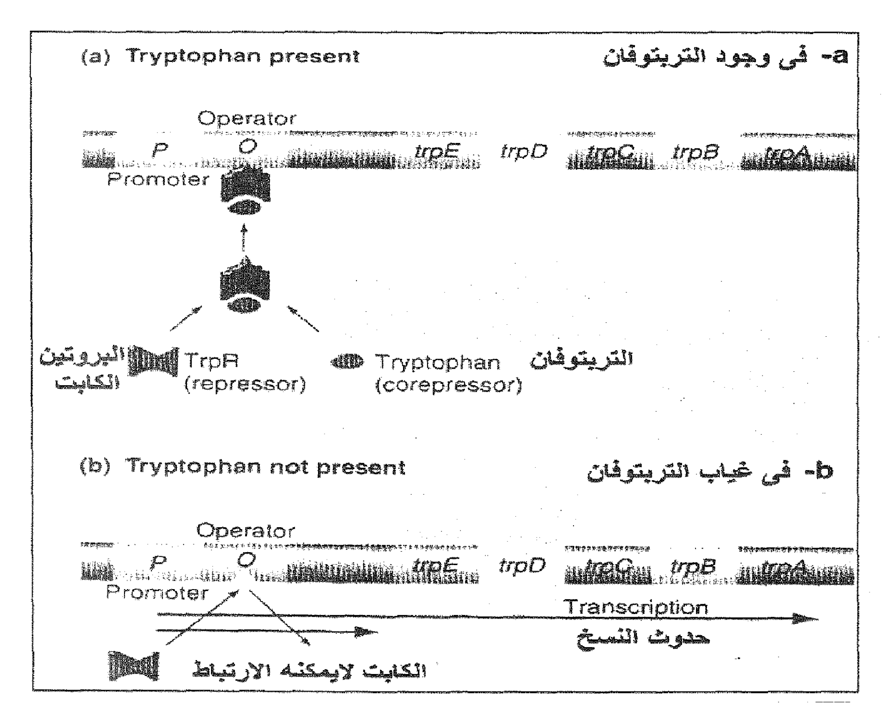
٢- في وجود سكر اللاكتوز يرتبط سكر اللاكتوز بالبروتين الكابت مما يؤدي إلى عدم قدرته على الأرتباط بالأوبريتور (O) وبذلك يستطيع إنزيم البلمرة RNA polymerase نسخ الچينات التركيبيـــة *lac Y, lac Z, lac A* فى صـــورة جـــزئ mRNA متعـــدد السترونـــات (Polycistronic Mrna) والذي تحدث له ترجمة بواسطة الريبوسومات إلى الإنزيمات الثلاثة.

ثانياً: النظام الكبتى Repressible system

يمثل اوبرون التربتوفان فى البكتيريا *E. coli* نموذج لتنظيم التعبير الچيني الكبتى فعلى الرغم من أن عملية التحفيز الچيني أصبحت معروفة منذ الأربعينات من القرن العشرين، إلا أنه حتى عام ١٩٥٣ لم يكتشف الاوبرون الكابت (Repressible operon) والذي اكتشفه العالم مونود (Monod) ومعاونيه بعد ذلك. فالطراز البري من البكتيريا *E. coli* يكون قادراً على إنتاج الإنزيمات الضرورية للتخليق الحيوي للأحماض الأمينية وكذلك التخليق الحيوي للجزيئات الكبيرة الضرورية الأخري. وإذا أخذنا فى الاعتبار الدراسات التى أجراها العالم مونود (Monod) عـــلى الحـــامض الأمـــيني التـــربتوفان وكذلك على إنزيم الـــTryptophan synthase فقد اكتشف أنه إذا وجد التربتوفان بكميات كافية فى البيئة الغذائية للبكتيريا النامية فإنه لا يحدث إنتاج للإنزيمات الضرورية للتخليق الحيوي لهذا الحامض الأميني ويعتبر الكبت النشط للچينات التى لها دور فى إنتاج هذه الإنزيمات يمثل درجة عالية فى اقتصاديات الطاقة فى الخلية البكتيرية عندما يوجد التربتوفان فى البيئة الغذائية. ولقد أوضحت دراسات أخري أن مجموعة الچينات التى تنتج الإنزيمات الضرورية للتخليق الحيوي للتربتوفان تكون متجاورة على الكروموسوم البكتيري فى البكتيريا *E. coli* وهذه الچينات هى جزء من اوبرون (Operon) ما وانه في وجود

التربتوفان يحدث كبت (Repressed) نسخ هذه الچينات بصورة مشتركة وأنه لا يحدث إنتاج لأى من هذه الإنزيمات. ونظراً لوجود التشابه الكبير بين هذا الكبت الإنزيمي والتحفيز الإنزيمي لميتابولزم سكر اللاكتوز. وضع العالمين چاكوب (Jacob) ومونود (Monod) نموذج تنظيم التعبير الچيني الكبتي مماثل لما هو موجود فى اوبرون اللاكتوز. ولتفسير الكبت الإنزيمي اقتراحا ان الكابت الطبيعي يكون غير فعال بمفرده على التفاعل والأرتباط بالأوبريتور ومع ذلك فأنه جزئ ذو خاصية Allosteric يمكنه أن يرتبط بالتربتوفان وعندما يوجد هذا الحامض الأميني (التربتوفان) فإن المركب الناتج من الأرتباط بينهما تكسبهما القدرة على الأرتباط بالأوبريتور وبالتالى يكبت (Repressing) نسخ الچينات ولا تتكون الإنزيمات (شكل ٣٨). وحيث أن المركب المنظم يكبت نسخ الاوبرون فإن هذا النظام الكبتي يكون تحت تحكم سالب ونظراً لأن التربتوفان يشترك فى الكبت، فإنه يسمي بإسم (Corepressor) فى هذا النموذج التنظيمي للتعبير الچيني.

ويعتبر تنظيم التعبير الچينى فى البكتيريا للچينات التى يحدث لها تحفيز (Induction) أو كبت (Repression) عن طريق نموذج الاوبرون (Operon model) هو النظام السائد لتنظيم التعبير الچينى للچينات عند مستوى نسخ الچين.



شكل (٣٨) : تنظيم التعبير الچيني لچينات اوبرون الترتبوفان (Tryptophan operon)

a. فى وجود التربتوفان:

يرتبط التربتوفان بالبروتين الكابت غير الفعال ويحوله إلى صورة تجعله قادراً على الأرتباط بالأوبريتور(O) وبالتالى يحدث قفل (Blocking) لنسخ الچينات التركيبية ومن ثم لا تنتج الإنزيمات الخمسة الضرورية للتخليق الحيوي للحامض الأميني التربتوفان.

b. فى غياب التربتوفان:

يقوم الچين الكابت R بإنتاج البروتين الكابت الذي بمفرده لا يستطيع الأرتباط بالأوبريتور (O) وبالتالى يستطيع إنزيم البلمرة RNA polymerase نسخ الچينات التركيبية A وB وC وD وE فى صورة جزئ mRNA متعدد السسترونات (Polycistronic mRNA) والذي يترجم بعد ذلك إلى الإنزيمات الخمسة الضرورية للتخليق الحيوي للحامض الأميني التربتوفان.

الباب السادس

تنظيم التعبير الچينى فى الكائنات حقيقية النواة

Regulation of Gene Expression In Eukaryotes

أوضحت الدراسات التى أجريت على أجنة حشــرة الدروسوفيلا Drosophila (ذبابة الفاكهة) وجود أنظمة من التعبير الچينى لعديد من الچينات المختلفة فى نفس الجنين مما يدل على وجود نظم دقيقة للتعبير الچينى. فالچينات وكذلك البروتينات التى تنتجها هذه الچينات يجب أن يظهر تعبيرها كما ينبغى فى خلايا خاصة وكذلك فى الأنسجة الخاصة فى الوقت الصحيح والمناسب فى الكائنات متعددة الخلايا لكى تنمو ويزدهر نموها.

وغالباً ما يكون تنظيم التعبير الچينى من خلال مجموعة من العمليات التى تتحكم فى كمية الــmRNA الناتج من چين ما وكما لاحظنا من قبل أن تنظيم التعبير الچينى فى الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) وكذلك العناصر المنظمة له تحدث عند موقع البروموتور (Promoter) والذى إما أن يكون هذا التنظيم للتعبير الچينى موجباً أو سالباً وذلك بالنسبة لعملية النسخ (Transcription). ومع ذلك ففى الخلايا حقيقية النواة يوجد عدد من النقاط المختلفة التى تتضمنها عملية تنظيم التعبير الچينى وهى:

١-معدل نسخ المنسخ الأولى Primary transcript (hnRNA).

٢-تحويل المنسخ الأولى (hnRNA) إلى جزىء الــmRNA الناضج من خلال العملية المعروفة بإزالة الانترونات ووصل الاكزونات (RNA splicing) وتكوين الــmRNA الناضج.

٣-ثبات جزيئات الـــmRNA.

٤- معدل ترجمة الـــmRNA إلى البروتين المناسب

٥-العمليات التى تحدث للبروتين بعد الترجمة.

٦-وجود البروتين الناتج من النسخ والترجمة فى الموقع المناسب من الخلية.

٧-ثبات البروتين الناتج من نسخ وترجمة الچين.

وسوف نتناول فيما يلى بعض الآراء حول هذه النقاط السابقة ومع ذلك يوجد خمسة فروق جوهرية بين تنظيم التعبير الچينى فى الكائنات حقيقية النواة والكائنات غير حقيقية النواة (البكتيريا) وهى:

١-تحتوى خلايا الكائنات حقيقية النواة على ثلاثة أنواع مختلفة من إنزيمات البلمرة (RNA polymerases) والتى تتعرف على بروموتورات مختلفة وأن هذه الإنزيمات تقوم بنسخ أقساماً مختلفة من الچينات بينما تحتوى خلايا الكائنات غير حقيقية النواة على نوع واحد من إنزيمات بلمرة الـــRNA.

٢-فى الكائنات حقيقية النواة لا يتم نسخ الچينات فى صورة جزيئات من الـــmRNA الناضجة ولكنها تنسخ فى صورة منسخ أولى (hnRNA) والذى ينسخ كل من الاكزونات (Exons) والانترونات (Introns) الموجودة فى الچين (الباب الثانى) وبذلك يجب تحويل هذا المنسخ الأولى إلى جزيء الـــmRNA الناضج عن طريق إزالة الانترونات ووصل الاكزونات والذى ينتقل من النواة إلى السيتوبلازم قبل ترجمته وبالتالى فإن عملية الترجمة غير مرتبطة بعملية النسخ ومن ثم فإن ذلك يعتبر فى غاية الأهمية فى تنظيم التعبير الچينى فى الكائنات حقيقية النواة. بينما فى الكائنات غير حقيقية النواة (البكتيريا) يوجد تداخل بين كل من عملية النسخ والترجمة وذلك لعدم وجود حواجز تمنع اتصال الريبوسومات (Ribosomes) بالـــmRNA لترجمته للبروتين المناسب بالإضافة إلى أن الچينات البكتيرية لا تحتوى على انترونات ومن ثم فإنها يتم نسخـــها مباشرة إلى جزيئات الــــmRNA الناضجـــة والتى يتم ترجمتها مباشـــرة (الباب الرابع) والأكثر من ذلك أن نفس الـــmRNA

يحمل الشفرات لأكثر من سسترون (Cistrons) والذى يعرف بالـ mRNA متعدد السسترونات والذى يتم ترجمته إلى عديد من أنواع البروتينات المختلفة (الباب الرابع) وهذه الچينات (السسترونات) يتم تنظيم تعبيرها الچينى بواسطة نموذج الاوبرون (Operon model).

٣- معظم الكائنات حقيقية النواة تكون متعددة الخلايا الأمر الذى يتطلب إضافة مستوى آخر من التعقيد إلى نموذج تنظيم تعبير الچين والذى يترتب عليه أن يظهر التعبير الچينى لچين ما بصورة صحيحة فى الخلايا المناسبة وفى الوقت الصحيح. ونظراً لاتصال الخلايا والأنسجة ببعضها فى الكائنات متعددة الخلايا حقيقية النواة فإن ذلك يتطلب توليد نظم دقيقة فى تنظيم التعبير الچينى فى هذه الكائنات حقيقية النواة.

٤- معظم الكائنات حقيقية النواة تحتوى على عديد من الكرموسومات بعكس الحال فى البكتيريا التى تحتوى على كروموسوم واحد مفرد وبذلك فإن تنظيم التعبير الچينى فى الكائنات حقيقية النواة يتطلب تحوير الكروماتين (Chromatin) فى هذه الكروموسومات والأكثر من ذلك أن التعبير الچينى لبعض الچينات فى الكروموسومات المختلفة يجب أن يكون بصورة متناسقة (Coordinate) وربما يتطلب التعبير الچينى للچينات المتجاورة أنظمة مختلفة من التعبير الچينى.

٥- تحتوى خلايا الكائنات حقيقية النواة على عديد من المكونات الخلوية المختلفة ذات الوظائف الخاصة داخل الخلية والتى لا تتواجد فى الخلية البكتيرية فضلاً عن أن البروتينات فى الخلايا حقيقية يجب أن تجد موقعها الصحيح داخل أو خارج الخلية لتقوم بوظائفها الملائمة والذى قد يتطلب حدوث عديد من التحورات المختلفة للبروتين لكى يظهر التعبير الوظيفى للبروتينات فى الكائنات حقيقية النواة.

وسوف نتناول بالشرح الآليات (Mechanisms) التى تستخدمها الكائنات حقيقية النواة لتنظيم التعبير الچينى عند المستويات المختلفة من بداية نسخ الچين وحتى تكوين البروتين الفعال وظيفياً وهذه المستويات من تنظيم التعبير الچينى هى:

١- تنظيم التعبير الچينى عند مستوى النسخ
Transcriptional level regulation
٢- تنظيم التعبير الچينى عند مستوى ما بعد النسخ
Posttranscriptional level regulation
٣- تنظيم االتعبير الچينى عند مستوى الترجمة
Translational level regulation
٤- تنظيم االتعبير الچينى عند مستوى ما بعد الترجمة
Posttranslational level regulation

أولاً : تنظيم التعبير الچينى عند مستوى النسخ

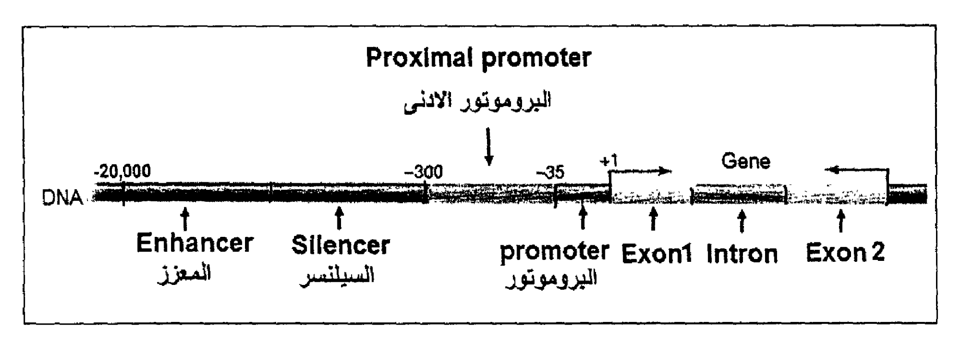
Transcriptional level regulation

يقصد بتنظيم التعبير الچينى عند مستوى النسخ هو تنظيم نسخ الچين وتكوين جزيئات الـــhnRRNA من عدمه ولذلك سوف نتناول العناصر اللازمة لنسخ الچين وهى البروموتور (Promoter) والبرموتور الادنى (Proximal promoter) والمعزز (Enhacer) والسيلنسر (Silencer) (شكل ٣٩):

١- البروموتور (Promoter)

يتركب البروموتور الذى يتعرف عليه إنزيم البلمرة (pol II) من عنصرين هما منطقة البداية Intiation region (InR) وتقع مجاورة لموقع بداية النسخ والتتابع النيوكليوتيدى المعروف بصندوقTATA (TATA box) أو بصندوق هوجنز (Hogness box) والذى يقع على بعد حوالى ٢٥ يوكليوتيدة شمال منطقة البداية (1nR). وعلى الرغم من أن كلا التتابعين السابقين كافيين لارتباط المركب البروتينى الأولى Pre-initiation complex (PIC) لبدأ النسخ وابتداء إنزيم البلمرة (pol II) البداية الصحيحة عند الموقع الصحيح إلا أن إنزيم البلمرة غير قادر بالصورة الكافية على تحديد موقع البروموتور بذاته والارتباط به والذى يتطلب تكوين المركب البروتينى الأولى لبداية النسخ ليرتبط

بالبروموتور ومن ثم يساعد فى ارتباط إنزيم البلمرة (pol II) بالبروموتور قبل أن تبدأ عملية نسخ الچين ويضم مركب بداية النسخ البروتينى الأولى (PIC) مجموعة كبيرة من الوحدات البروتينية المختلفة من بينهما الوحدة البروتينية التى ترتبط بالصندوق (TATA box) من البروموتور والمعروفة باسم TATA-binding proteins (TBP) مما يؤدى ذلك إلى تعزيز ارتباط عوامل النسخ الأخرى من الارتباط بالبروموتور. وكذلك ارتباط إنزيم البلمرة pol II بالـــDNA عند تتابع معين محدد (البروموتور) وينتج عن ذلك كله تكوين مركب بداية النسخ الأولى والذى يسمح بحدوث المستوى الأساسى basal level من النسخ ولحدوث أعلى معدل من مستوى نسخ الچين يكون من خلال ارتباط بروتينات أخرى معينة بمناطق كل من المعزز (Enhancer) وبعناصر البروموتور الأدنى (Proximal-promoter).



شكل (٣٩): يوضح العناصر اللازمة لنسخ الچين وهى البروموتور (Promoter) والبرموتور الادنى (Proximal promoter) والمعزز (Enhacer) والسيلنسر (Silencer) .

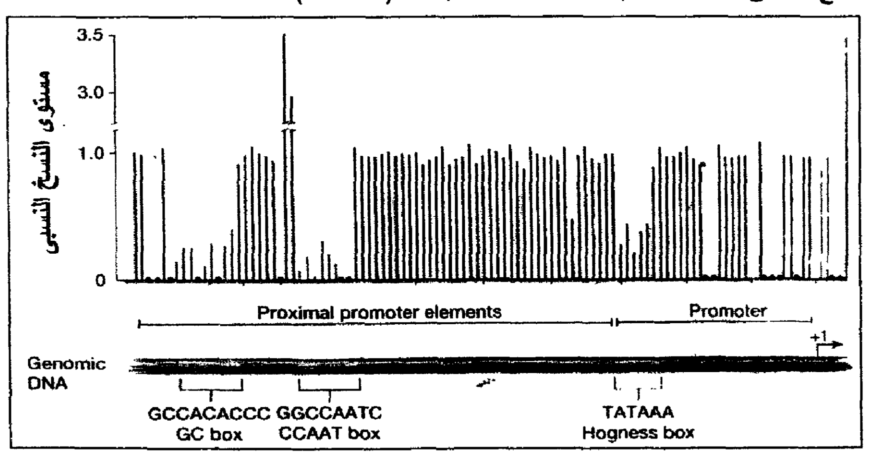
٢- عناصر البروموتور الأدنى Proximal-Promoter Elements

عناصر البروموتور الأدنى ضرورية لتوجية مستوى النسخ المناسب لچين ما. وعادة ما توجد هذه العناصر فى التتابعات النيوكليوتيدية الأولى فى الجزء الشمالى من البروموتور على الرغم من أنها أحياناً قد تمتد فى الطول أكثر من ذلك. وهذه التتابعات النيوكليوتيدية يرتبط بها بروتينات معينة والتى إما أن تنشط (Activate) أو تكبت (Repress) عملية النسخ وربما يحتوى الچين الواحد على أكثر من عشرة مواقع مختلفة من هذه التتابعات النيوكليوتيدية والتى يرتبط

بها منشطات أو مكبتات عملية النسخ التى تحدد ما إذا كان الچين سيتم نسخه وبأى مستوى. ولقد أمكن تحديد قسمين رئيسين من عناصر البروموتور الأدنى وهما:

أ- عناصر البروموتور الأدنى الوراثية (Generic proximal-promoter)

وهى عبارة عن الصندوق (CCAAT box) وكذلك الصندوق (GC box) وتقع هذه التتابعات النيوكليوتيدية على شمال الچين بيتاجلوبين (β-globin gene) كما هو مبين فى (شكل ٤٠). ولقد أمكن استحداث طفرات فى هذه المواقع عند مواقع نيوكليوتيدية معينة باستخدام المطفرات التى تسبب الطفرات الموضعية الموجهة (Site-directed DNA mutagenesis) وأمكن توقيع (Ploted) موقع الطفرات بالنسبة لمعدل النسخ النسبى بالنسبة للطفرات المستحدثة الموجهة (شكل ٤٠)



شكل (٤٠) : يوضح الطفرات التى تحدث فى بروموتور چين بيتاجلوبين (β-globin gene). وكذلك الطفرات التى تحدث فى البروموتور الأدنى (Proximal promoter) وتأثيرها على مستوى نسخ الچين حيث تم استحداث طفرات عند مستوى التغير فى يوكليوتيدة واحدة فى المنطقة شمال (Upstream) الچين بيتا جلوبين وتم تقدير مستوى النسخ لكل طفرة. والموقع النسبى لكل طفرة يمثل بخط رأسى فى هذا الشكل بينما يمثل ارتفاع هذا الخط الرأسى مستوى النسخ لكل طفرة بالمقارنة بالبروموتور الطبيعى ويتضح من هذا الشكل أن الطفرات التى حدثت فى المناطق الثلاثة وهى Hogness box و GC box و CCAAT box سببت انخفاضاً معنوياً فى مستوى نسخ الچين بينما الطفرات التى وقعت خارج هذه المناطق الثلاثة السابقة كان لها تأثير منخفض جداً على النسخ.

ووجد أن الطفرات التي تحدث في المناطق الثلاثة المختلفة وهي صندوق هوجنز (Hogness box) والصندوق (CCAAT box) والصندوق (GC box) سببت انخفاضاً معنوياً في معدل نسخ الجين بيتا جلوبين بينما الطفرات التي حدثت خارج هذه المناطق الثلاثة السابقة لم يكن لها تأثير يذكر على معدل نسخ الجين وعلي ذلك فإن التتابع النيوكليوتيدي المكون من ٣٠٠ يوكليوتيدة علي شمال جين بيتاجلوبين والممثلة في العناصر الثلاثة السابقة تمثل العناصر الرئيسية التي يتطلبها المستوى المناسب لنسخ الجين. والأكثر من ذلك انه اذا تحرك أي من الصندوقين (CCAAT box) أو (GC box) بعيداً عن الصندوق هوجنز (TATA box) الي مكان آخر فإنهما يفقدان مقدرتهما علي تنشيط أعلي معدل من النسخ الجيني وبالتالي فإن هذه العناصر الوراثية تتطلبها عملية تنظيم كمية نسخ الجين أكثر من أنها تتحكم في أين ومتى يحدث النسخ الجيني .

وتوجد البروتينات التي ترتبط بالصندوق (GC box) والصندوق (CCAAT box) في كل الخلايا والتي تحدد مقدرة هذه التتابعات النيوكليوتيدية في توجيه الخلايا أو الأنسجة الخاصة علي عملية النسخ حيث يرتبط البروتين (SPI) بالصندوق (GC box) بينما يرتبط عامل النسخ البروتيني (CTF) بالصندوق (CCAAT box). والسؤال الذي يطرح نفسه كيف تساعد هذه البروتينات في التأثير علي مستوى نسخ الجين؟.

ويمكننا تصور النموذج (Model) الذي يربط عامل بداية النسخ (TFIID) إنزيم البلمرة Pol II بالبروموتور من خلال الوحدة البروتينية (TBP) والمرتبطة بصندوق هوجنز وكذلك ارتباط الوحدة البروتينية (TAFII150) والوحدة البروتينية (TAFII250) بمنطقة البداية (1nR) كما هو مبين في (شكل ٤١) فعندما يوجد الصندوق (GC box) علي البعد المناسب من الصندوق هوجنز فسوف يرتبط البروتين (SP1) بالصندوق (GC) كما يساعد في ارتباط وثبات مركب بداية النسخ ($TF_{II}D$) من خلال تفاعله مع الوحدة البروتينية (TAFII 110) كما هو مبين في (شكل ٤١) وسوف يؤدي هذا التفاعل الي زيادة في كفاءة بداية النسخ مما يترتب عليه إنتاج المنسخ الأولي (hnRNA) من الجين بمستوي مرتفع.

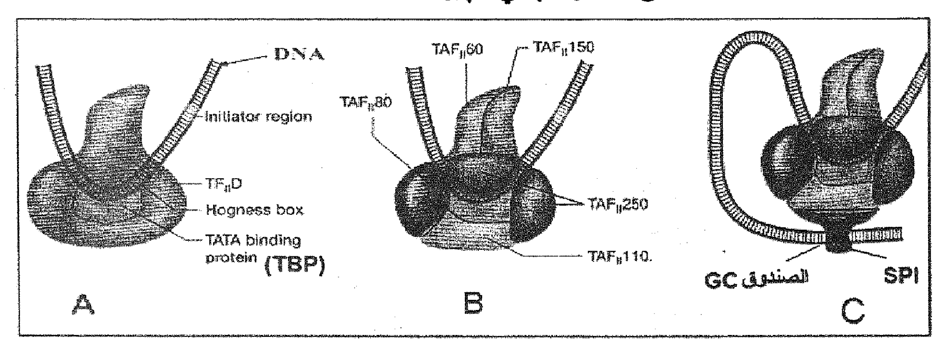
ب- عناصر البروموتور الأدني المتخصص للخلية أو النسيج

Cell or tissue specific–proximal–promoter elements

تسلك عناصر هذا البروموتور الأدنى المتخصص للخلية أو النسيج من حيث الوظيفة نفس سلوك عناصر البروموتور الأدنى الوراثية، ومع ذلك يوجد اختلافين أساسيين بين عناصر هذا البروموتور الأدنى المتخصص للخلية أو النسيج وعناصر البروموتور الأدني الوراثية وهما:

١- عدد العناصر المتخصصة للخلية أكبر بكثير معنويا والتي توجد في المنطقة شمال الچين عن العناصر الوارثية للبروموتور الأدنى.

٢- البروتينات التى ترتبط بهذه العناصر المتخصصة للخلايا والأنسجة تظهر في مجموعة من الخلايا في الكائن عند أوقات معينة أثناء النمو ومن ثم فإن نظام ظهور هذه البروتينات التي ترتبط بالـــDNA سوف يحدد ويملى التعبير الچيني للچين.



شكل (٤١) : نموذج يوضح دور عناصر البروموتور الأدنى الوراثية فى تنظيم التعبير الچينى

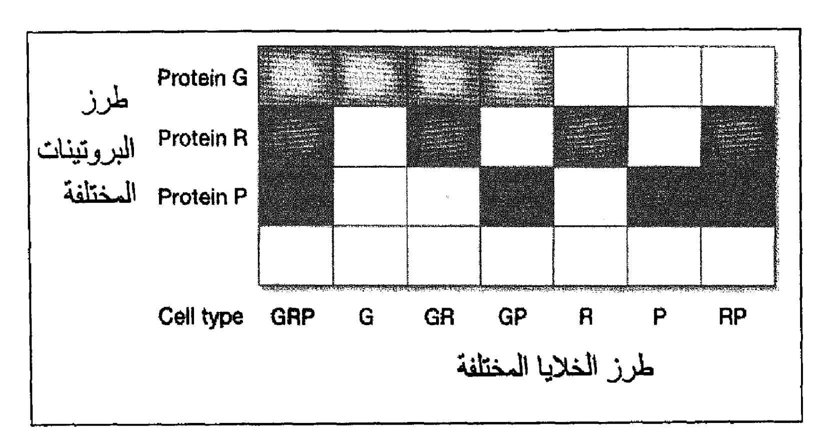
A. نموذج ارتباط البروتين (TBP) بصندوق هوجنز وارتباط البروتين (TF_{II} D) بمنطقــة البروموتــور وارتبــاط البروتين TBP بصندوق هوجنز (Hogness box) يسبب انثناءاً معنوياً للـــDNA

B. نموذج تفاعل الوحدات البروتينية (TAFII 150) و (TAFII 250) بمنطقة البدايـــة (InR) وإضـــافة وحـــدات بروتينية أخرى إلى مركب بداية النسخ (TF_{II} D).

C. نموذج ارتباط البروتين (SPI) بالصندوق (GC box) والذى يقع على شمال صندوق هوجنز. هذا البروتين (SPI) يتفاعل ايضا مع البروتين (TAFII 110) الموجود فى مركب بداية النسخ (TF_{II} D) وذلك للمساعدة فى ارتباطه أو تثبيته بمنطقة البروموتور قبل أن تبدأ عملية النسخ.

ويقترح أن تنظيم التعبير الچينى بمثل هذا النموذج أن نسخ الچين يعتمد على عوامل النسخ الموجودة أو غير الموجودة فى خلية معينة. والمقدرة على تمييز خلية معينة يحدث فيها النسخ يعتمد على ظهور عوامل النسخ التى ترتبط بالـــ DNA (شكل ٤٢). ففى هذا المثال يوجد ثلاثة عوامل نسخ مختلفة لتنشيط عملية النسخ وهى البروتينات P, R, G وعن طريق ظهور هذه البروتينات الثلاثة المختلفة فى الأنظمة الخلوية المختلفة فسوف يتولد سبعة أقسام فريدة والتى فى أى منها يظهر تعبير أحد هذه البروتينات الثلاثة على الأقل وبالتالى فإن هذه البروتينات الثلاثة سوف تسمح بإنتاج سبعة أنظمة مختلفة للنسخ والتى يجب أن تناظر الأنظمة الموجودة فى الخلايا المختلفة أو الأنسجة المختلفة وهى التى يظهر فيها تعبير البروتينات التالية GRP أو G أو GR أو P أو R أو P أو RP . ويجب أن نلاحظ أن عامل النسخ سوف يظهر فى نسيج واحد أثناء النمو ثم بعد ذلك يتلاشى من هذا النسيج ثم يظهر فى نسيج آخر فى مرحلة متأخرة من النمو. وظهور عامل النسخ الواحد فى أوقات مختلفة من النمو يسمح للبروتين بالتفاعل مع منشطات النسخ فى مجموعة متنوعة من الخلايا أو الأنسجة. وهذا التعبير الچينى المعقد يعتبر أحد الآليات (Mechanisms) لتوليد نظام محكم ودقيق لتنظيم التعبير الچينى عند مستوى النسخ والذى تحتاجه الكائنات متعددة الخلايا.

وفى هذا النموذج الافتراضى أفترضنا ثلاثة أنواع مختلفة من البروتينات التى ترتبط بالـــDNA وهى البروتينات G و R و P وتمثل المربعات المظللة تعبير البروتين المناظر فى خلية معينة وبالأخذ فى الاعتبار التوافيق المختلفة بين هذه البروتينات الثلاثة المختلفة فإنه يمكن تحديد سبعة طرز خلوية (Cell types) سوف يظهر فيها احد هذه البروتينات الثلاثة على الاقل والتى ترتبط بالـــDNA.



شكل (٤٢): يوضح نموذج أفتراضى لتنظيم التعبير الجينى عن طريق طرز البروتينات المختلفة

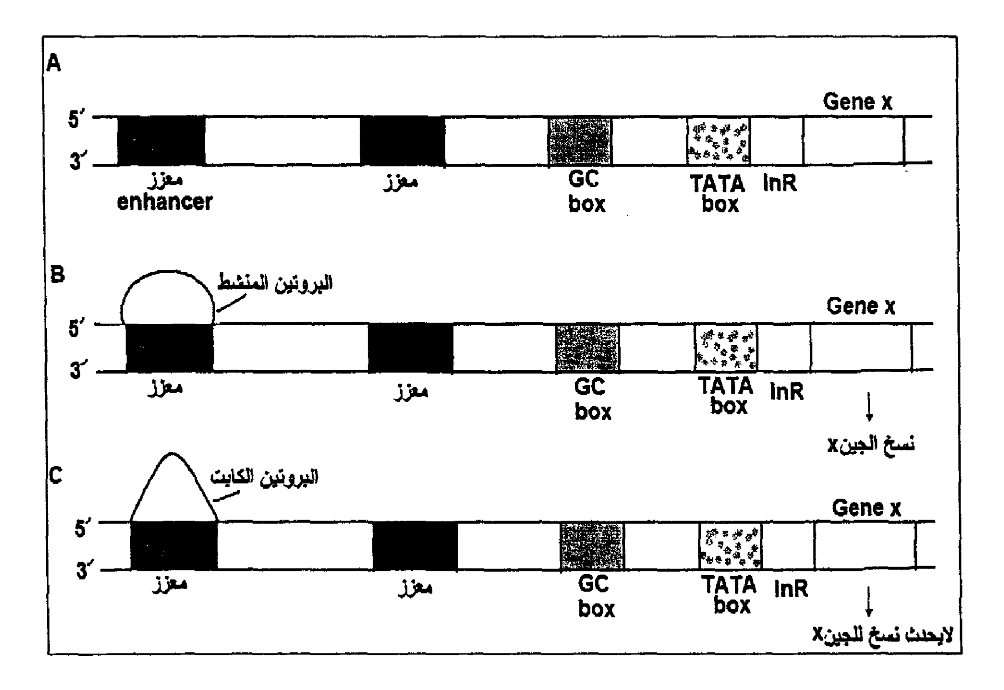
٣-المعـــززات **Enhancers**

المعززات هى تتابعات من الـــDNA والتى يرتبط بها البروتينات للتحكم فى نسخ جين ما فى خلية ما أو نسيج ما. وتسمى البروتينات التى ترتبط بالمعززات بالمنشطات (Activators) وذلك لإنها تسبب زيادة فى نسخ الجين. ومع ذلك فإن البروتينات الكابته (Repressors) يمكنها أيضاً أن ترتبط بالمعززات وتسبب كبت نسخ الجين. ومهما كانت المسافة بين المعزز والجين فإنها لا تفقده مقدرته على تنظيم نسخ الجين، فعلى سبيل المثال قد تكون المسافة بين المعزز والجين مقدارها حوالى ١٠٠٠٠ نيوكليوتيدة يمي أو شمال الجين ومع ذلك يظل قادراً على اظهار تأثيره على تنظيم نسخ الجين. وعلى العكس من ذلك اذا تحرك الصندوق GC عن موضعه الطبيعى لمسافة مقدارها ٥٠ نيوكليوتيدة شمال الجين سوف يمنعه من تنشيط نسخ الجين.

ويتحكم عناصر البروموتور الأدنى فى مستوى نسخ جين ما وأن فقد مثل هذه العناصر ينتج عنه نقص كبير فى مستوى نسخ الجين. وعلى العكس من ذلك فإن المعززات تؤثر على أعلى مستوى لنسخ الجين وكذلك تتحكم فى نظام التعبير الجينى من حيث الوقت والنسيج الذى يحدث فيه نسخ الجين وعلى ذلك فإن فقد معزز ما يعنى انه سوف يحدث اختزال فى نسخ الجين وكذلك

حدوث نسخ للچين فى الوقت الخطأ والنسيج الخطأ. كذلك اذا تحرك معزز ما بالقرب من چين آخر فسوف يوجه نسخ هذا الچين الآخر.

وتقوم المعززات بدورها فى تنظيم نسخ چين ما من عدمه من خلال احتوائها على مواقع ارتباط البروتينات التى يتعرف عليها عوامل النسخ المنشطة لنسخ الچين أو تلك التى تكبت نسخ الچين (شكل ٤٣).



شكل (٤٣): نموذج يوضح كيفية تأثير البروتينات التى ترتبط بالمعززات (Enhancers) على عملية النسخ

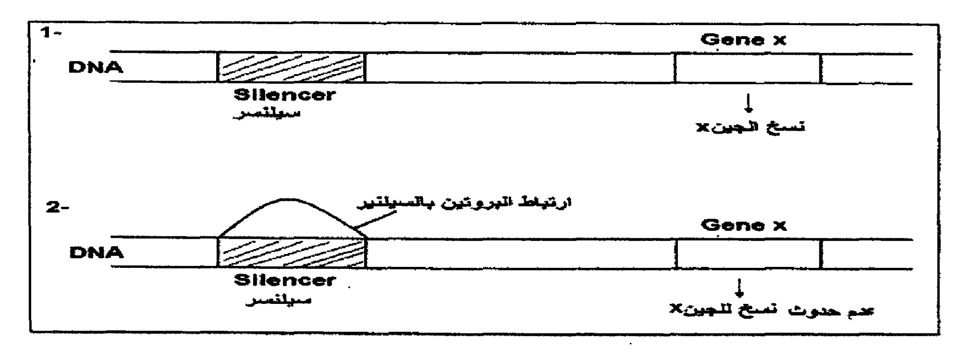
A. الترتيب الطولى لمواقع الارتباط بالــDNA شمال الچين وكذلك موقع بداية النسخ الموجود داخل منطقة بداية النسخ (InR) والمعززين (Enhancers) على شمال الصندوق (GC box) .

B. ارتباط البروتين المنشط بالمعزز يسبب حدوث نسخ للچين x .

C. ارتباط البروتين الكابت بنفس بالمعزز يسبب عدم حدوث نسخ للچين x

٤-السيلنسرز Silencers

السيلنسرز هى ايضاً تتابعات من الــDNA تنظم نسخ الچين من عدمه عن طريق ارتباط البروتينات بها. وفى الكائنات حقيقية النواة تعتبر السيلنسرز هى طراز من تنظيم التعبير الچينى السالب حيث يحدث نسخ للچين فى حالة عدم ارتباط البروتين بالسيلنسر بينما لا يحدث نسخ للچين عندما يرتبط البروتين بالسيلنسر (شكل ٤٤). والسيلنسرز التى تكبت نسخ الچين يرتبط بها البروتينات التى تغير شكل الــDNA حيث يرتبط بعض البروتينات بسيلنسرز خاصة وتحور الكروماتين لچين ما من الظراز ايوكروماتين (Euchromatin) إلى الطراز هتروكروماتين (Heterochromatin) وبالتالى لا يحدث نسخ للچين أو يكبت نسخ الچين.

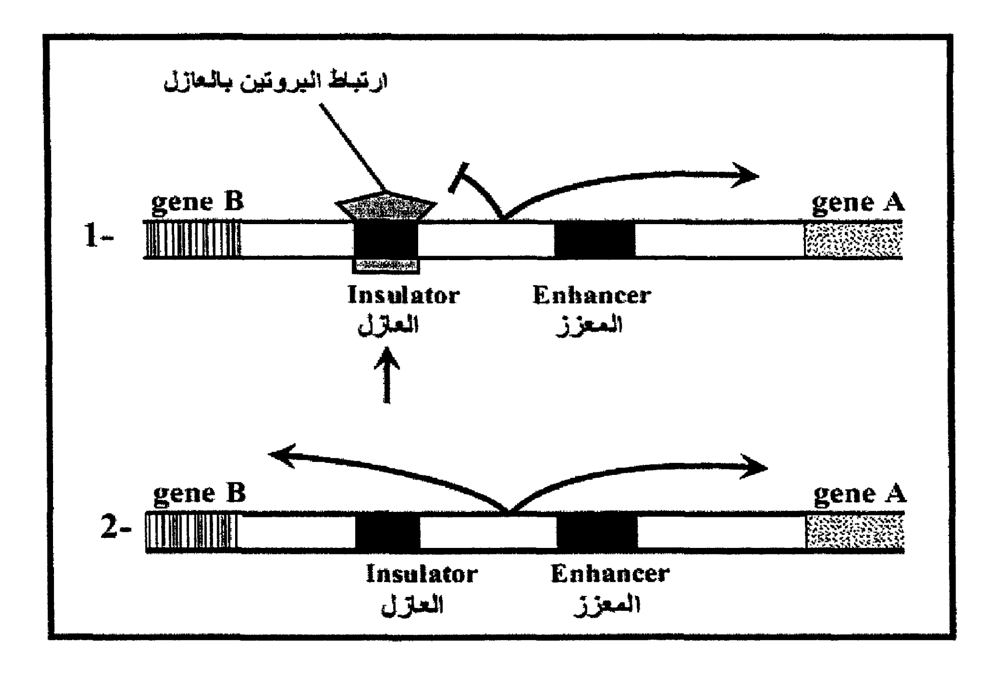


شكل (٤٤): تأثير السيلنسر (Silencer) على عملية النسخ يقع السيلنسر على مسافة ١٠٠٠٠ نيوكليوتيدة شمال الچين الذى يتحكم فى نسخه. اما الچين الذى يحدث له نسخ لا يرتبط بالسيلنسر أى بروتين (1) . ومع ذلك عندما يرتبط البروتين بالسيلنسر فإنه يكبت (Suppress) عملية النسخ (2).

٥-العازلات Insulators

من أهم خصائص المعززات (Enhancers) والسيلنسرز (Silencers) الهامة هى قدرتها فى أن تكون فعالة وظيفياً سواء كانت فى شمال أو يمين الچين حتى ولو كانت على مسافات بعيدة من چين ما. والعازلات عبارة عن عناصر من الــDNA تحجب چين ما من تأثير المعزز المجاور لهذا الچين (شكل ٤٥).

والعازلات عبارة عن تتابعات من الـــDNA يرتبط بها البروتينات التى تتعرف على هذه العازلات . فعلى سبيل المثال فإن العازلات فى حشرة الدروسوفيلا (Drosophila) تحتوى على التتابع النيوكليوتيدى الثابت والمحفوظ وهو GAGA والذى يرتبط به البروتين TrL.
فإذا حدث طفور لأى من التتابع GAGA أو البروتين TrL يصبح العازل غير فعال وظيفياً. ومع ذلك فإن الآليه التى بواسطتها تغلق العازلات تأثير المعززات مازالت غير معروفة.



شكل (٤٥): يوضح نموذج تفاعل العازل (A model for insulator action)

1–وقوع عازل ما (Insulator) بين الچين B والمعزز (Enhancer) سوف يمنع المعزز من تنشيط نسخ الچين B عندما يرتبط بالعازل بروتين ما.

2– فقد الارتباط بين البروتين والعازل سوف يسمح بالمعزز من التحكم فى نسخ الچين B ومن ناحية أخرى يتم تنظيم نسخ الچين A بواسطة نفس المعزز.

تنظيم نسخ الچين بواسطة هرمون الثيرويد

Regulation of gene transcription by thyroid hormone

يلعب عنصر الاستجابة لهرمون الثيرويد (THRE) والذى يوجد على شمال عديد من الچينات دوراً فى تنظيم التعبير الچينى. فعندما يرتبط مستقبل هرمون الثيرويد بهذا الهرمون ثم بعد ذلك يرتبطان بعنصر الاستجابة لهرمون الثيرويد (THRE) فإنه ينشط نسخ الچين وعندما يرتبط مستقبل هذا الهرمون فقط بعنصر الاستجابة للهرمون فإنه يكبت نسخ الچين. وفى مثل هذا السلوك فإن الچين الذى يحدث له نسخ بمستوى أساسى منخفض سوف يحدث زيادة فى نسخه فى وجود الهرمون أو يخضع لمزيد من انخفاض معدل النسخ فى غياب الهرمون وبالتالى يؤثر وجود أو غياب هرمون الثيرويد على تنظيم نسخ الچين (شكل ٤٦). ويمكن تلخيص ما سبق فى النقاط التالية:

١- التتابعات النيوكليوتيدية الهامة فى تنظيم نسخ چين ما هى:

- البروموتور (Promoter)
- البروموتور الأدنى (Proximal-promoter)
- المعززات (Enhancers)
- السيلنسرز (Silencers)
- العازلات (Insulators)

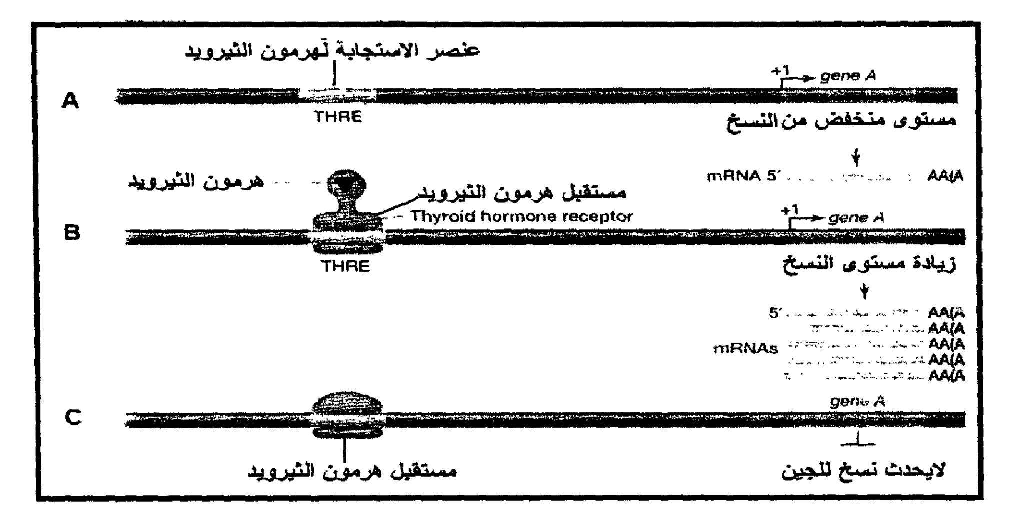
٢- ينظم كل من البروموتور والبروموتور الادنى المستوى الأساسى لنسخ چين ما وإذا تغير موقع كل من البروموتور والبروموتور الادنى معنوياً بالنسبة لموقعهما من موقع بداية نسخ الچين فإن ذلك يؤثر على نسخ الچين.

٣- تنظم كل من المعززات والسيلنسرز أعلى مستوى لنسخ الچين فى المكان المناسب والوقت المناسب وأنهما يمكنها أن تقع على شمال أو يمين الچين على بعد مسافة تصل إلى ١٠٠٠٠ يوكليوتيدة من موقع بداية نسخ الچين وارتباط البروتينات المختلفة بمواقع ارتباطها داخل معزز ما أو بين معززات مختلفة وكذلك بالسيلنسرز يحدد نظام التعبير النهائى للچين ومستوى هذا التعبير.

دور البروتينات ميك Myc وماكس Max فى نسخ الچين

The roles of Myc and Max proteins in gene transcrition

أوضحنا فيما سبق أن المعززات هى عبارة عن تتابعات من الـــDNA يرتبط بها البروتينات والتى إما أن تنشط أو تكبت نسخ چين ما ويعتمد ذلك على البروتين الذى يرتبط بالمعزز وكذلك التفاعل مع البروتينات الآخرى وأنه من الممكن لبروتين ما أن يرتبط بمعزز معين ويعمل كمنشط فى خلية ما ومكبت فى خلية أُخرى وفيما يلى أمثلة على هذا النوع من البروتينات.



شكل (٤٦): يوضح آلية تنظيم التعبير الچينى عن طريق عنصر مستقبل هرمون الثيرويد (THRE) بالـــDNA

A- فى غياب كل من هرمون الثرويد ومستقبله يحدث نسخ للچين A بمستوى منخفض.

B- فى وجود كل من هرمون الثرويد ومستقبله يرتبطا معاً بالموقع THRE ويعمل هذا الموقع كمعزز (Enhancer) لنسخ الچين A ويزداد مستوى نسخ هذا الچين.

C- ارتباط مستقبل هرمون الثيرويد فقط بالموقع THRE وبالتالى يعمل هذا الموقع كسيلنسر (Silencer) لنسخ الچين A ولا يحدث له نسخ.

١-البروتين ميك (Thy Myc protein)

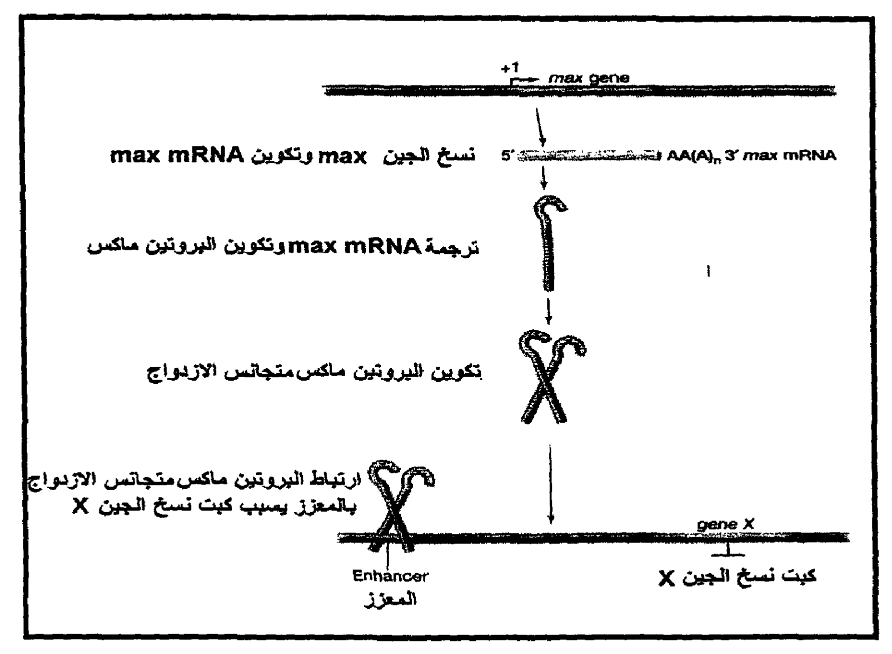
هذا البروتين (Myc) يرتبط بالـDNA ويسبب هذا الارتباط تنشيط نسخ الچينات التى تحمل شفرات البروتينات التى تحتاجها عملية الانقسام الخلوى. وعلى ذلك فإن هذا البروتين غالباً ما يتواجد فى الخلايا النشطة فى الانقسام الخلوى ولا يوجد فى الخلايا التى تشكلت وتوقفت عن الانقسام الخلوى. والچين (Myc) الذى يحمل شفرات هذا البروتين هو أيضاً بروتوانكوچين (Proto-oncogene) . والتعبير الخاطىء لهذا الچين فى الخلايا المتشكلة وإنتاجه للبروتين ميك يدفعها للانقسام الخلوى مرة أخرى بصورة نشطة انقسامات متتالية يترتب عليه تكوين الورم (Tumor). كذلك أوضحت الدراسات الفيزيائية على هذا البروتين أنه منشط للنسخ.

٢-البروتين ماكس (The Max protein)

البروتين ماكس ينقصه الجزء البروتينى الذى ينشط نسخ الچينات وقد يتواجد فى صورة متجانسة الإزدواج (Homodimer) أو فى صورة غير متجانسة الإزدواج (Heterodimer) عندما يرتبط بالبروتين ميك (Myc). وللبروتين ماكس قدرة كبيرة على التفاعل مع البروتين ميك وتكوين بروتين غير متجانس الإزدواج أكثر من تفاعله مع نفسه لتكوين بروتين ماكس متجانس الإزدواج. ونظراً لأن البروتين ماكس (Max) يتواجد فى كل الخلايا فى كل الأوقات فإنه عادة ما يتواجد فى صورة متجانسة الإزدواج يمكنه الارتباط بالمعزز. ونظراً لأنه ينقصه النشاط النسخى فإن ارتباط البروتين ماكس (Max) متجانس الإزدواج بالمعزز سوف يكبت (Represses) نسخ الچين (شكل ٤٧). وعندما يتواجد البروتين ميك (Myc) يفشل البروتين (Max) فى تكوين جزيئى متجانس الإزدواج ويفضل أن يصبح فى صورة غير متجانسة الإزدواج بارتباطه مع البروتين ميك (Myc) والذى يرتبط بالـDNA عند تتابع نيوكليوتيدى معين (المعزز Enhancers) فإنه ينشط نسخ الچين (شكل ٤٨). وعلى ذلك فإن البروتين ماكس عبارة عن وحدة بروتينية لها خاصية كل من الكابت والمنشط والتى ترتبط بنفس المعزز والفرق بينهما يرجع إلى ما إذا كان البروتين ماكس فى صورة متجانسة الإزدواج أو فى صورة غير متجانسة الإزدواج مع البروتين ميك. ويكون النظام ميك-

ماكس (Myc-Max) فعال وظيفياً فى كبت نسخ الچين اذا كان البروتين ماكس فى صورة متجانسة الإزدواج (شكل ٤٧)

ويكون هذا النظام منشط لنسخ الچين إذا كان البروتين ماكس والبروتين ميك فى صورة غير متجانسة الإزدواج كما هو مبين فى (شكل ٤٨). ونظراً لأن البروتين ماكس (Max) يفضل أن يكون فى صورة غير متجانسة الإزدواج مع البروتين ميك (Myc) فسوف يتناقص كبت نسخ الچين عندما يتواجد البروتين ميك Myc.

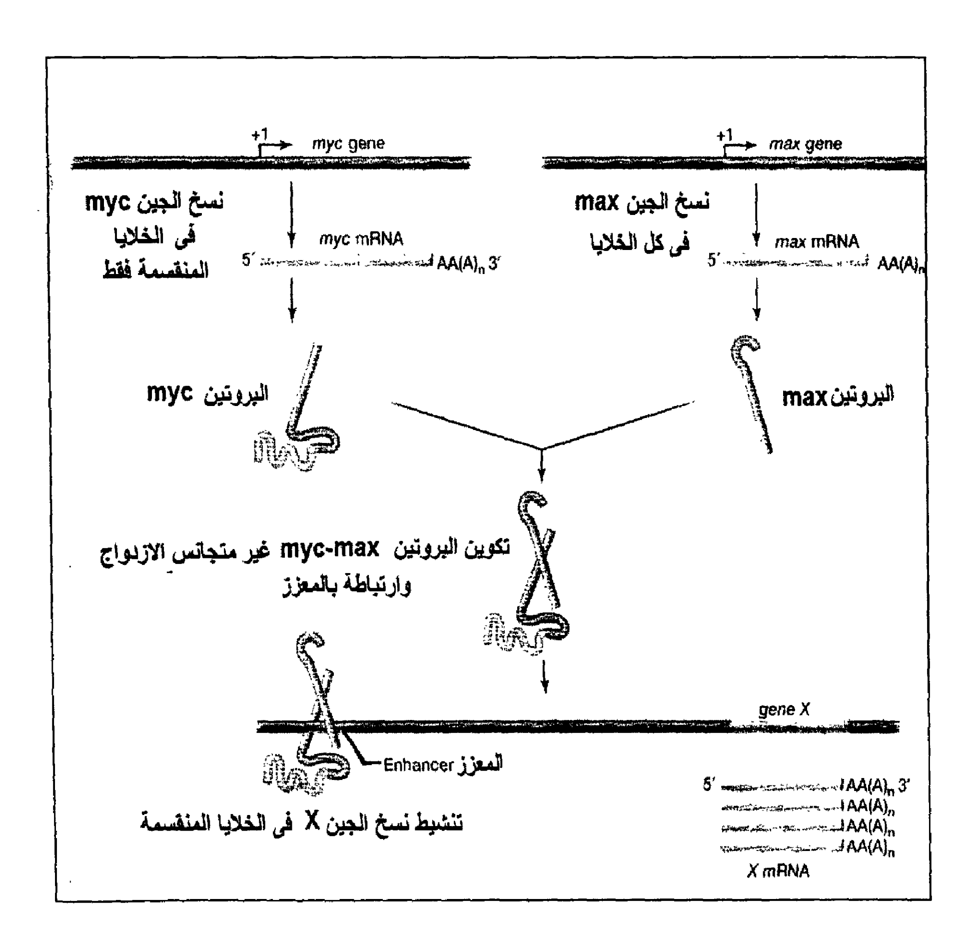


شكل (٤٧): يوضح نموذج كبت نسخ الچين بواسطة البروتين Max المتجانس الإزدواج

A model for repressing gene transcription by the Max homodimer

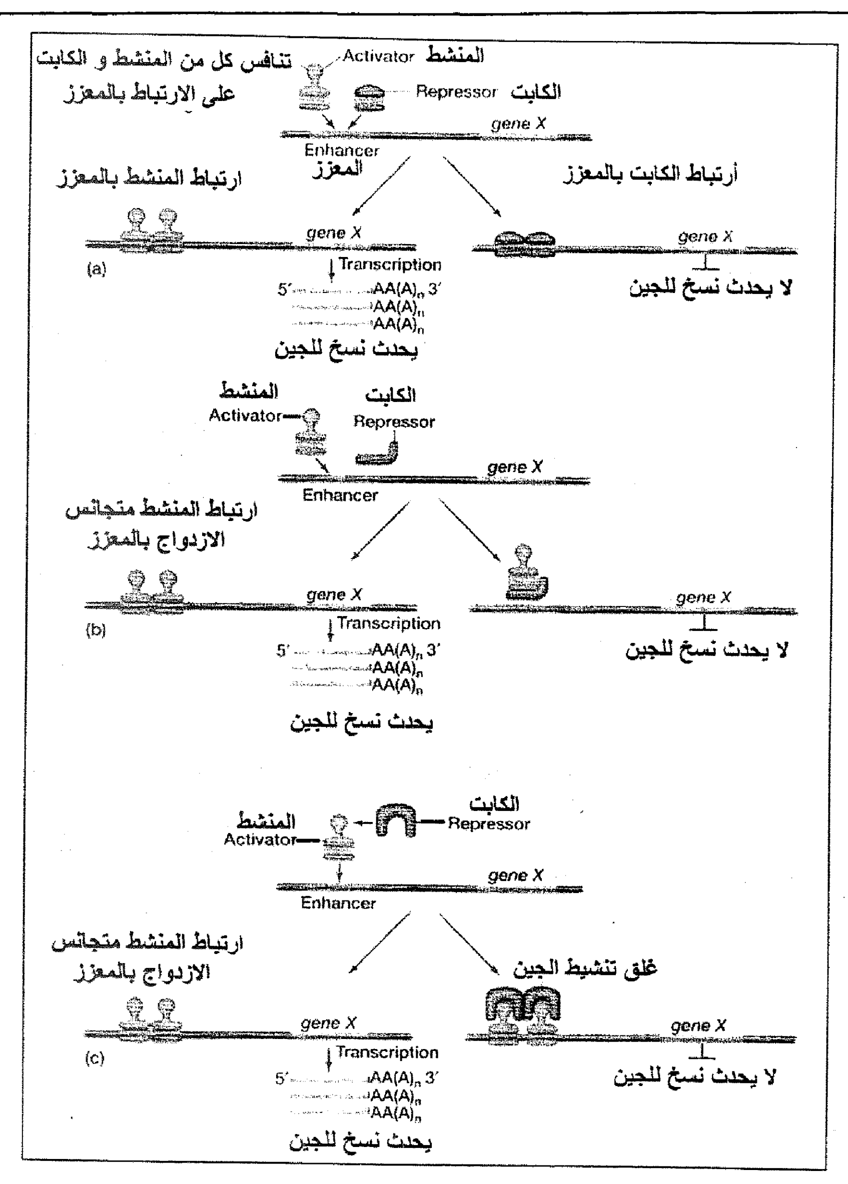
يحدث نسخ للچين Max فى كل الخلايا والذى يترجم إلى البروتين Max ثم بعد ذلك يتكون البروتين Max المتجانس الإزدواج (Max homodimer) والذى يرتبط بمعزز خاص (Specific enhancer) على الـDNA وغلق (Blocks) نسخ عديد من الچينات وذلك لأن البروتين Max ينقصه الجزء الذى ينشط عملية النسخ.

وغالباً ما تكون الكابتات (Repressors) فعالة وظيفياً من خلال آليتين واللتان تختلفان عن بعضهما طبقاً لذلك الجزء من البروتين الذى يرتبط بالمنشط وبالتالى يحجب بواسطة الكابت. وفى الآلية الأولى يرتبط الكابت بالبروتين المنشط والذى يترتب عليه حجب ارتباط المنـــشط بالــــ DNA (شكل ٤٩) ومن ثم يصبح المنشط غير قادر على الارتباط بالمعزز كما هو الحـــال فـــى حالة الجزيء غير متجانس الإزدواج وفى الآلية الثانية يرتبط الكابت بـــالجزء التنـــشيطى مـــن المنشط ولكن هذا الارتباط بينهما لا يفقد المنشط القدرة على الارتباط بالمعزز ولكنه لا يـــستطيع تنشيط نسخ الچين (شكل ٤٩). ومقدرة ارتباط البروتينات مع الـــDNA لتكوين وحدات مزدوجة (Dimmer) يسمح بوجود مستوى آخر من تنظيم التعبير الچينى والمعروف باسم النظام التنافسى بين تكوين جزيئات متجانسة الإزدواج أو جزيئات غير متجانسة الإزدواج.



شكل (٤٨): يوضح نموذج تنشيط نسخ الجين بواسطة البروتين Max-Myc غير متجانس الإزدواج
Model for activating gene transcription by the Max-Myc heterodimer

يحدث تعبير لكل من الجين Myc والبروتين Myc الناتج منه فقط فى الخلايا التى تنقسم بينما يحدث تعبير للجين max والبروتين Max الناتج منه فى كل الخلايا وبالتالى يتكون البروتين غير متجانس الإزدواج (Myc-Max heterodimer) فى الخلايا المنقسمة والذى يرتبط بمعزز ما وبالتالى ينشط عملية نسخ الجينات الهدف. ومعظم هذه الجينات الهدف يكون لها دور فى عملية الانقسام الخلوى.



شكل (٤٩):يوضح تنظيم التعبير الچينى من خلال آليات تنافس كل من البروتين المنشط (Activator) والبروتين المكبت(Repressor) على الارتباط بنفس المعزز (Enhancer)

شرح شكل (٤٩)

a- ارتباط المنشط بالمعزز ينشط نسخ الچين X بينما ارتباط المكبت بنفس المعزز يكبت نسخ الچين.

b- ارتباط الكابت بالمنشط يتكون مركب غير متجانس الإزدواج (Heterodimer) لا يستطيع الارتباط بالمعزز وبالتالى لا يحدث نسخ للچين X ومن ناحية أُخرى يستطيع المنشط متجانس الإزدواج تنشيط نسخ الچين X بارتباطه بالمعزز.

c- ارتباط المنشط بالمعزز ثم ارتباط الكابت بالمنشط الذى ينشط النسخ وبذلك يحدث غلق لنسخ الچين X بينما يستطيع المنشط متجانس الإزدواج الارتباط بنفس المعزز لتنشيط نسخ الچين X.

دور الكروماتين فى تنظيم التعبير الچينى

The Role of Chromatin in Regulation of Gene Transcription

ناقشنا من قبل ارتباط الطرز المختلفة من البروتينات بالتتابعات النيوكليوتيدية المختلفة من الـــDNA لتنظيم نسخ الچين. ومع ذلك فإنه لكى ترتبط البروتينات بالـــDNA الچينومى فإنه يجب أن يكون متاحاً أو سهل المنال لهذه المنشطات أو المكبتات وبالمثل إتاحة الفرصة لإنزيم البلمرة (pol II) والبروتينات الموجودة فى مركب بداية النسخ ($TF_{II}D$) للتعرف على البروموتور الموجود فى الـــDNA الچينومى.

ومن المعروف أن الـــDNA الچينومى فى الكائنات حقيقية النـــواة يتواجـــد فـــى صـــورة كروماتين (Chromatin) والذى هو عبارة عن المركب المكون من الـــDNA وعديد مـــن أنـــواع البروتينات. والارتباط الشديد بين الـــDNA الچينومى مع البروتينات وخاصة بروتينات الهـــستون فى صورة نيكليوسوم (Nucleosome) يعتبر هذا الارتباط هو العامل الرئيسى فـــى كبـــت نـــسخ الچين. وعلى ذلك فإن ابتداء النسخ يحتاج إلى تحوير الكروماتين لكى يصبح الـــDNA الچينومى سهل المنال من آلة النسخ. ويوجد عديد من الآليات التى يمكنها أن تحور النيوكليوسوم والذى ينتج عنـــه إعـــادة شـــكل الكرومـــاتين (Chromatin) وهـــى:

١- إضافة وإزالة مجاميع الاسيتايل إلى ومن بروتين الهستون

1- Histone Acetylation and Deacetylation

فى الكائنات حقيقية النواة يتركب النيوكليوسوم من نسختين من كل من بروتينات الهستون الأربعة وهى البروتينات H4, H3, H2B, H2A وبروتين الهستون الخامس (H1) يرتبط بالـ DNA الرابط (Linker DNA) والذى يقع بين النيكليوسومات . ونظراً لأن هذه الهستونات تقوم بنفس الوظيفة فى كل الكائنات حقيقية النواة فإن دورها فى تنظيم التعبير الچينى يجب أن يكون محفوظاً فى كل الكائنات حقيقية النواة.

وقد تتواجد الهستونات فى صورة هستونات مضاف إليها مجاميع الاسيتايل أو فى صورة هستونات لا تحتوى على مجاميع الاسيتايل وتضاف مجاميع الاسيتايل إلى الأحماض الأمينية الليسين (Lysines) الطرفية فى الهستونات H4, H3 ومن ثم فإن الهستونات المضاف إليها مجاميع الاسيتايل تكون مرتبطة بالچينات التى تنسخ بينما الهستونات المزال منها مجاميع الاسيتايل توجد بالقرب من الچينات التى تكبت (Repressed) من حيث النسخ.

ويتم إضافة مجاميع الاسيتايل بواسطة مجموعة من الإنزيمات تسمى Histone acetyltransferases(HATs) حيث تقوم بإضافة مجاميع الاسيتايل إلى بروتينات الهستون H4, H3 التى تم تخليقها جديداً ثم بعد ذلك تصدر هذه الهستونات إلى النواة لتدخل فى النيوكليوسومات (Nucleosomes).

ومن المشوق والمثير أن نلاحظ أن الوحدة البروتينية (TAFII 250) التى تدخل فى تركيب مركب بداية النسخ (TFIID) والتى ترتبط بمنطقة البداية (1nR) من البروموتور (Promoter) أثناء تكوين مركب بداية النسخ الأولى لها القدرة أيضاً على الارتباط بالأحماض الأمينية الليسين (Lysines) المضاف إليها مجاميع الاسيتايل وعلى ذلك فإنه من الممكن أن تتعرف الوحدة البروتينية (TAFII250) على مناطق البداية المرتبط بها بروتينات الهستون المضاف إليها مجاميع

الاسيتايل وارتباط الوحدة البروتينية (TAFII250) أيضاً يسبب إضافة مجاميع الاسيتايل إلى بروتينات الهستونات القريبة ليجعل الـــDNA أكثر إتاحة لبداية النسخ.

وتحتوى الخلايا أيضاً على إنزيمات إزالة مجاميع الاسيتايل من بروتينات الهستون وهى Histone deacetylase (HDALs) والتى تختزل عدد مجاميع الاسيتايل الموجودة فى بروتينات الهستون H4, H3. وهذه الإنزيمات (HDALs) ضرورية لاختزال مستويات إضافة مجاميع الاسيتايل والتى تحتاجها عملية كبت النسخ.

ولقد أوضحت الأدلة والبراهين الحديثة أن البروتينات التى ترتبط بالـــDNA تتعرف على تتابع معين من الـــDNA وليس ذلك فقط بل أنها أيضاً تتعرف على حالة بروتينات الهستون المضاف إليها مجاميع الاسيتايل ومن ثم فإنها تسبب زيادة إتاحة الـــ DNA إلى المنشطات الأُخرى وكذلك لإنزيم البلمرة (pol II). وبالمثل فإن ارتباط كابت ما بالـــDNA سوف يطوع إنزيمات (HDALs) والتى تختزل إضافة مجاميع الاسيتايل إلى بروتينات الهستون بمزيد من كبت النسخ عن طريق جعل الـــDNA أقل إتاحة للنسخ.

٢- إضافة مجاميع الميثايل إلى الهستون — 2- Histone Methylation

إضافة مجاميع الاسيتايل إلى بروتينات الهستون ليست هى التحور الوحيد الذى يحدث لبروتينات الهستون حيث أنه وجد أن كل من الأحماض الأمينية الليسين (lysines) والارجنين (Arginines) الموجوده فى البروتينات الهستونية الأربعة (H2A, H2B, H4, H3) يمكن أن يحدث إضافة لمجاميع الميثايل (Methylations) لهذه الأحماض الأمينية بواسطة إنزيم Histone methyltransferase(HMTase) وبينما إضافة مجاميع الاسيتايل تُسبب تنشيط النسخ فقط فإن إضافة مجاميع الميثايل (Methylation) لبروتينات الهستون يمكنه أن ينشط أو يكبت النسخ (شكل ٥٠) ويمكن تلخيص ما سبق ذكره فى النقاط التالية:

١- إعادة شكل الكروماتين هو تغير فى موقع النيوكليوسوم أو التفاعل بين النيوكليوسوم والذى تتطلبه عملية كبت (Repression) أو تنشيط (Activation) نسخ الچين.

٢- يتحكم فى مستوى إضافة مجاميع الاسيتايل (Acetylation) لبروتينات الهستون إنزيمات إضافة وإزالة مجاميع الاسيتايل HDALs, HATs على الترتيب. وعموماً فإن زيادة إضافة مجاميع الاسيتايل مرتبط بتنشيط النسخ.

٣- إضافة مجموعة الميثايل لبروتينات الهستون يمكنه أن ينشط أو يكبت النسخ. وتوجد شبكة معقدة من التنظيم والتى فيها يؤثر نظام إضافة مجاميع الاسيتايل على إضافة مجموعة الميثايل إلى بروتينات الهستون وان إضافة الميثايل تؤثر على إضافة مجاميع الاسيتايل. هذه الحالة المعقدة تسمح بتنظيم النسخ لبعض الچينات.

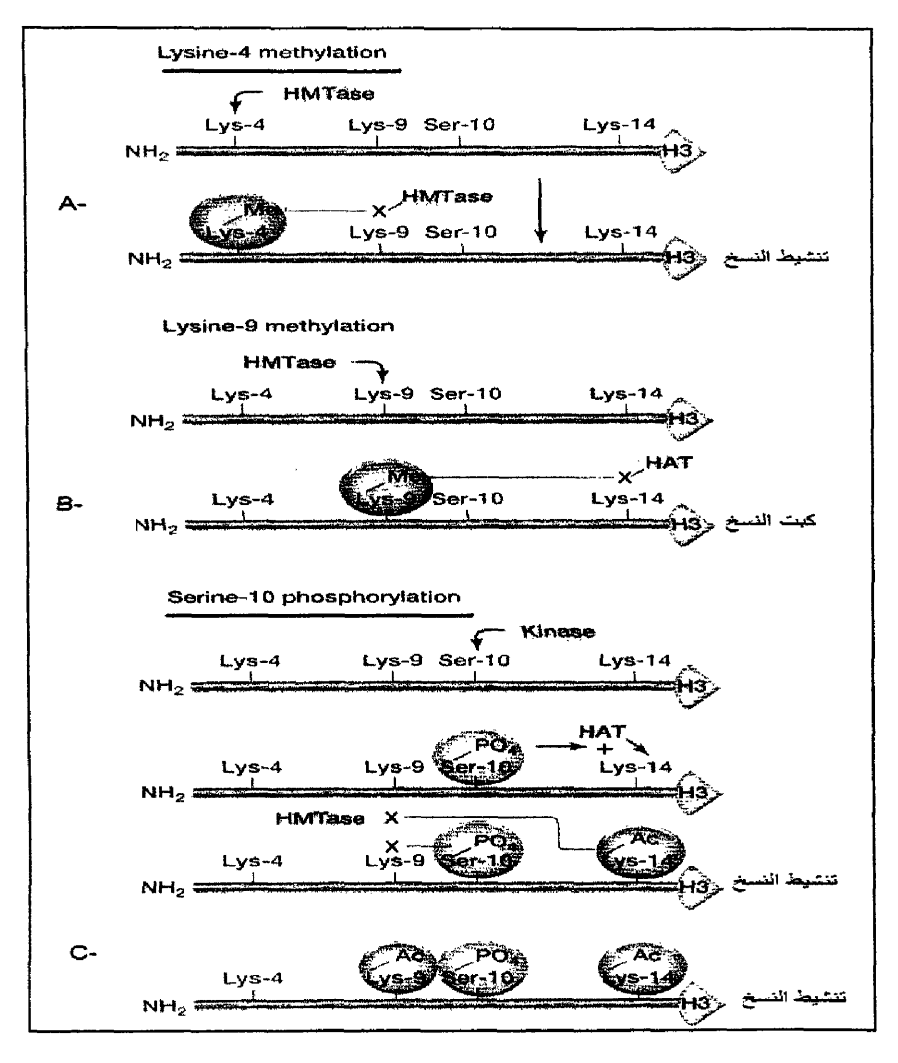
٤- يوجد طرز مختلفة من الهستونات والتى يمكنها أن تدخل فى النيوكليوسومات لتغيير حالة الكروماتين. وفى بعض الحالات فإن بروتينات إعادة شكل الكروماتين تتطلب إعادة وضع هستون مختلف داخل النيوكليوسوم.

٣- إضافة مجاميع الميثايل للـ DNA   3-Methylation of DNA

تلعب إضافة مجاميع الميثايل للـ DNA دوراً هاما فى التفاعل بين البروتينات والـ DNA. وفيما سبق ناقشنا دور إضافة مجموعة الميثايل إلى بروتينات الهستون والتى يمكنها أن تكبت نسخ بعض الچينات وفيما يلى سوف نتناول إضافة مجاميع الميثايل للـ DNA والتى يمكنها أن تكبت أيضاً النسخ مؤدياً ذلك إلى سكون الچين (Gene silencing).

ففى الكائنات حقيقية النواة يحدث إضافة مجموعة الميثايل للقاعدة سيتوسين (Cytosine) بواسطة إنزيم DNA methylase بنسبة بسيطة. ومعظم قواعد السيتوسين (C) التى يحدث لها إضافة بمجموعة الميثايل تكون تلك المجاورة للقاعدة جوانين Guanine (G) فى نفس خيط الـ DNA (CpG) . وفى الإنسان تصل نسبة السيتوسين (C) المضاف إليه مجموعة الميثايل إلى ٨٠% من التتابع النيوكليوتيدى (CpG) والذى قد يصل ما بين ١٠٠٠ إلى ٢٠٠٠ نيوكليوتيدة بالتتابع (CpG) والتى تقع على بعد عديد من مئات أزواج القواعد على شمال بداية نسخ الچين إلى عديد من مئات ازواج القواعد على يمين الچين. وعلى ذلك فإن عديد من التتابعات (CpG) فى

نفس خيط الـ DNA تقع بالقرب من بروموتورات (Promoters) جينات الكائنات حقيقية النواة وهذا الموقع لهذه التتابعات (CpG) يعتبر موقع نموذجى لتنظيم النسخ (شكل ٥١) .



شكل (٥٠): تنشيط أو كبت النسخ بإضافة مجموعة الميثايل أو الفسفرة لبعض الأحماض الأمينية فى بروتين الهستون.

شرح شكل (٥٠)

A- إضافة مجموعة الميثايل للحامض الأمينى الليسين رقم ٤ بواسطة إنزيم Histon methyltransferase (HMTase) يغلق إضافة مجموعة الميثايل لليسين رقم ٩ وبالتالى يحدث تنشيط للنسخ

B- إضافة مجموعة الميثايل لليسين رقم ٩ يغلق إضافة مجموعة الميثايل لليسين رقم ١٤ وبالتالى يحدث كبت للنسخ

C- فسفرة الحامض الأمينى السيرين رقم ١٠ ينشط إضافة مجموعة الاسيتايل لليسين رقم ١٤ والذى يؤدى بدوره إلى غلق إضافة مجموعة الميثايل لليسين رقم ٩ وبالتالى يحدث تنشيط للنسخ وكذلك فسفرة السيرين رقم ١٠ ينشط إضافة مجاميع الاسيتايل لكل من الليسين رقم ٩ والليسين رقم ١٤ ومن ثم يحدث تنشيط للنسخ

بالتتابع (CpG) والتى تقع على بعد عديد من مئات أزواج القواعد على شمال بداية نسخ الچين إلى عديد من مئات ازواج القواعد على يمين الچين. وعلى ذلك فإن عديد من التتابعات (CpG) فى نفس خيط الـــ DNA تقع بالقرب من بروموتورات (Promoters) چينات الكائنات حقيقية النواة وهذا الموقع لهذه التتابعات (CpG) يعتبر موقع نموذجى لتنظيم النسخ (شكل ٥١) .

وتتلازم درجة إضافة مجموعة الميثايل للـــDNA مع درجة سكون چين ما. وفى الچينات المعروفة باسم الچينات المدبره (Housekeeping genes) والتى تنتج البروتينات فى كل الخلايا وفى كل الأوقات فى الكائنات متعددة الخلايا وجد أن إضافة الميثايل إلى السيتوسين فى التتابع (CpG) يكون عند أدنى مستوى له. وعلى العكس من ذلك فإن الچينات التى لا تبدى تعبيرها فى خلايا خاصة أو نسيج خاص تحتوى على درجة عالية من إضافة مجموعة الميثايل للسيتوسين فى التتابع (CpG) وعلى ذلك فإن إضافة مجموعة الميثايل للـــDNA لها دور فى سكون النسخ (Silencing transcription) والمثال الواضح على سكون النسخ هو وجود أحد كروموسومى X بصورة غير نشطة فى أى خلية جسمية لإناث الثدييات وبتحليل هذا الكروموسوم (X) غير النشط أتضح أنه يحتوى على درجة عالية من إضافة مجموعة الميثايل لقواعد السيتوسين فى التتابع (CpG) عن كروموسوم (X) الآخر النشط..

وتوجد آلية أُخرى تتضمن تحديد وتعيين البروتينات التى ترتبط بالـDNA المضاف إليه مجاميع الميثايل (Methylated DNA) . هذه البروتينات التى ترتبط بخيط الـDNA المضاف اليه مجاميع الميثايل فى التتابع النيوكليوتيدى (CpG) والمعروفه باسم Methyl-CG-binding proteins تتعرف على السيتوسين المضاف اليه مجموعة الميثايل بغض النظر عن التتابع النيوكليوتيدى المجاور (شكل ٥١). وعلى ذلك فإنه من الممكن لهذه البروتينات التى ترتبط بالـDNA تعزيز الارتباط بإنزيمات إزالة مجاميع الاسيتايل من بروتينات الهستون (HDALs) والذى يؤدى إلى مزيد من كبت النسخ عن طريق اعادة شكل الكروماتين. ومن الواضح أن إضافة مجاميع الميثايل للـDNA (DNA methyllation) إلى القاعدة سيتوسين (C) فى التتابع (CpG) تحدث فى جميع الكائنات. وهذه العملية تكبت نسخ الچينات عن طريق منع المنشطات من الارتباط بتتابع معين من الـ DNA وكذلك بارتباط البروتينات بالتتابعات (CpG) التى تحتوى على مجموعة ميثايل بالقاعدة سيتوسين (C) والتى تطوع إنزيمات ازالة مجاميع الاسيتايل (HDALs) من بروتينات الهستون H4, H3 وبالتالى لا يحدث نسخ للچين (شكل ٥١).

ثانياً : تنظيم التعبير الچينى عند مستوى ما بعد النسخ

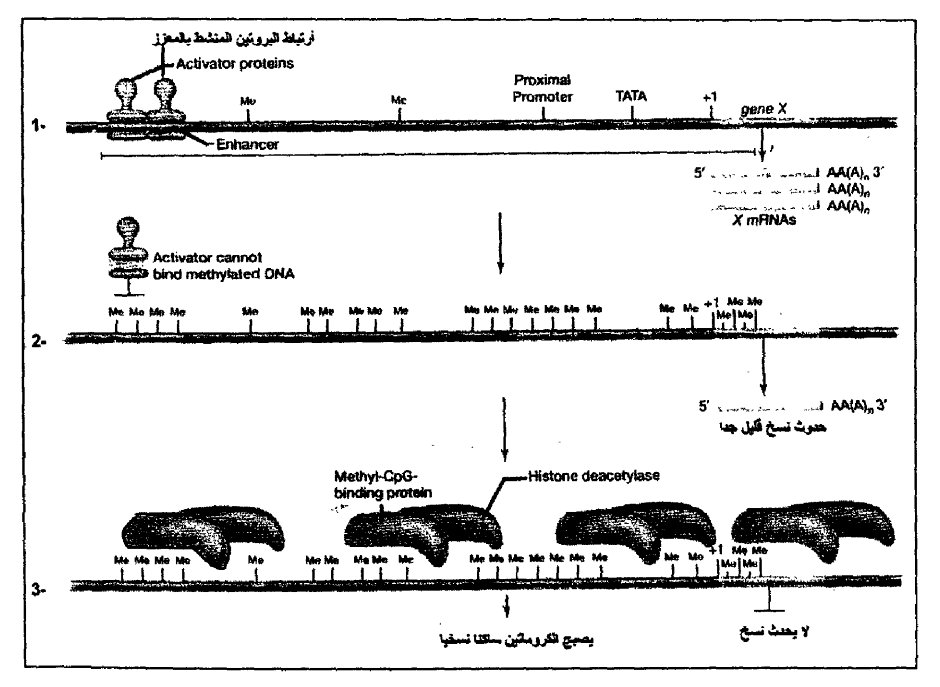
Posttranscriptional level regulation

يقصد بتنظيم التعبير الچينى لچين ما عند مستوى ما بعد النسخ هى تلك الآليات التى تحدث وتسبب تعطيل ترجمة جزىء الـmRNA إلى البروتين المناسب ومنها ما يلى:

١- الـ RNA الدقيق (miRNAs) Micro RNAs

هذا النوع من الـ RNA (miRNAs) ينظم التعبير الچينى لچين ما عن طريق تعطيل ترجمة الـ mRNA إلى البروتين المناسب إما عن طريق تكسير الـmRNA المناظر أو عن طريق اقتران أزواج القواعد بين الـmiRNA والـmRNA وغلق ترجمة الـ mRNA إلى البروتين. فاذا كان الـmiRNA يحمل القواعد المكملة لتلك الموجودة فى الـmRNA فإنه يحدث للـmRNA كسر عند موقع خاص. وهذا الكسر يمنع ترجمة الـmRNA إلى البروتين المناسب

وعلى العكس من ذلك إذا وجد عدد محدد من الاقتران الخاطىء بين الـــmiRNA والـــmRNA فإن المنطقة المزدوجة الخيط الناتجة عن الاقتران تغلق الترجمة بدون حدوث كسر للـــmRNA وحدوث أى من الحدثين ينتج عنه انخفاض فى كمية البروتين الناتجة من ترجمة الـــmRNA الناتج من هذا الجين. ومثل هذا التنظيم فى التعبير الجينى عند هذا المستوى يعرف بالتنظيم الجينى ما بعد نسخ الجين (Posttranscriptional regulation) .



شكل (٥١): يوضح نماذج كبت النسخ بإضافة مجاميع الميثايل للـــDNA

١ – ارتباط البروتين المنشط بمعزز ما لينشط نسخ الجين X

٢ – إضافة مجاميع الميثايل (Me) إلى التتابع النيوكليوتيدى CpG المتعدد يمنع ارتباط المنشط بالمعزز ويحدث نسخ قليل للجين X .

٣ – ارتباط البروتين بالتتابعات CpG المضاف اليها مجاميع الميثايل يطوع إنزيم ازالة مجاميع الاسيتايل من الهستون وبالتالى يحدث ازالة لمجاميع الاسيتايل من الهستونات H_3 و H_4 ويصبح الكروماتين ساكن نسخياً ولا يحدث نسخ للجين X.

٢- الـــRNA مضاد المعنى Antisense RNA

القسم الآخر من الـــRNA الذى يلعب دوراً فى تنظيم التعبيير الچينى ما بعد النسخ يسمى بالـــRNA مضاد المعنى والذى ينظم أيضاً ترجمة الـــmRNA إلى البروتين المناسب. ويحمل هذا النوع من الـــRNA المضاد المعنى (Antisense RNA) بعض التتابع النيوكليوتيدى المكمل للـــmRNA الهدف ويقترن به والذى يترتب عليه أحد النتائج التالية (شكل ٥٢):

١. أن هذا الاقتران بين أزواج القواعد المكملة بين هذا الـــRNA المضاد المعنى والطرف $5^/$ من الـــmRNA المعين يغلق ترجمة الـــm RNA إلى البروتين المناسب.

٢. إذا حدث الاقتران متضمناً كل من الاكزون (Exon) والانترون (Intron) يؤدى ذلك إلى غلق تحويل المنسخ الأولى (hnRNA) إلى جزيء الـــmRNA الناضج والذى سوف يذهب إلى السيتوبلازم لترجمته إلى البروتين المناسب.

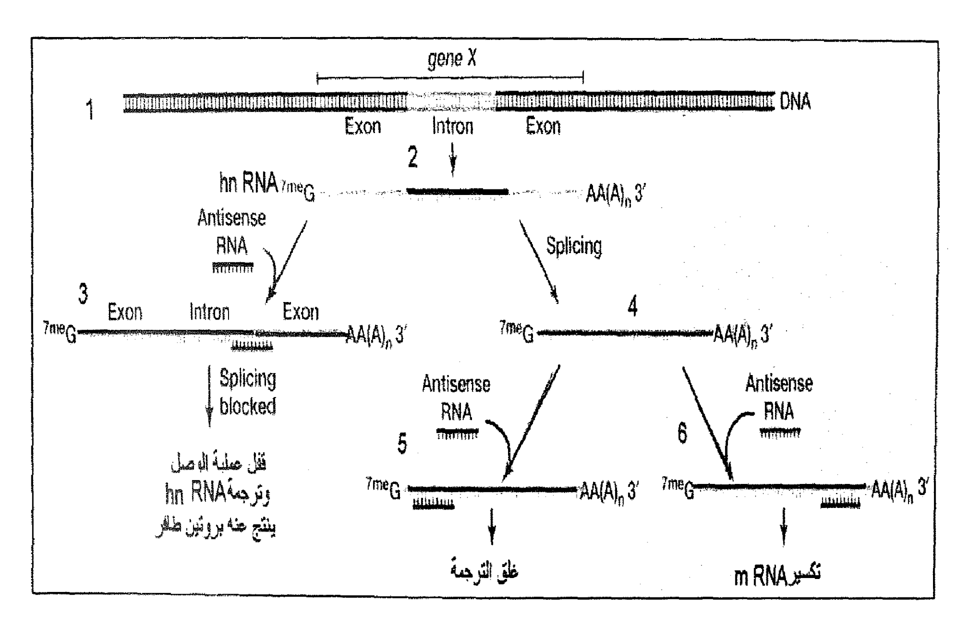
٣. أن الاقتران بين الـــRNA مضاد المعنى والطرف $3^/$ من الـــmRNA الناضج يؤثر على ثبات الـــ mRNA وينتج عن ذلك تكسيره.

وهذا النظام من تنظيم التعبير الچينى هو أيضاً مثال لتنظيم التعبير الچينى ما بعد النسخ.

٣- البروتينات التى ترتبط بالمناطق التى لا تترجم من الـــ mRNA فى الطرف $3^/$

Proteins Binding to $3^/$ Untranslated Regions ($3^/$UTR)

أحد آليات تنظيم التعبير الچينى ما بعد النسخ تتضمن ارتباط بروتين ما بالـــmRNA لتبدى تأثيرها. وبالرغم من أننا ناقشنا عديد من البروتينات التى ترتبط بالـــDNA فإنه يوجد أيضاً قسم من البروتينات والتى تتعرف بطريقة خاصة على الـــmRNA وترتبط به وغالباً ما ترتبط هذه البروتينات بالطرف $3^/$ من الـــmRNA الذى لا يترجم ($3^/$UTR) وتحويره وكبت (Repress) ترجمته.



شكل (٥٢): يوضح آلية تفاعل الــRNA مضاد المعنى فى الخلية

Mechanism of antisense RNA action in a cell

١ – الــDNA الچينومى الذى يحتوى على الچين (X) الذى يتركب من اكزونين (2 Exons) ويقع بينهما انترون واحد (Intron).

٢ – نسخ هذا الچين وتكوين المنسخ الأولى hnRNA .

٣ – ارتباط الــAntisense-RNA بالــhnRNA فى المنطقة بين الأنترون والأكزون الثانى عن طريق الاقتران بين أزواج القواعد المكملة وبالتالى يغلق تحويله (Splicing) إلى الــmRNA الناضج ومن ثم فإن ترجمة الــhnRNA ينتج عنها بروتين طافر.

٤ – حدوث عملية الوصل للــhnRNA بازالة الانترونات وتجميع الاكزونات وتكوين الــmRNA الناضج.

٥ – ارتباط الــAntisense RNA بالطرف $5'$ من الــmRNA وبذلك يغلق ترجمتة.

٦ – ارتباط الــAntisense RNA بالطرف $3'$ poly A وبذلك يصبح الــmRNA غير ثابت ويحدث له تكسير.

٤- الوصل البديل Alternative Splicing

أحد الآليات الأخرى لتنظيم التعبير الچينى ما بعد النسخ هى الوصل البديل للمنسخ الأولى (hnRNA) لإنتاج عديد من الـــmRNA وهذا الوصل البديل يستعمل الاكزونات (Exons) المتنوعة لإنتاج جزيئات مختلفة من الـــmRNA من نفس المنسخ الأولى (hnRNA) . وأحد نتائج الوصل البديل هو القدرة على إنتاج بروتينات مختلفة من نفس الچين وهذا الوصل البديل شائع فى الإنسان لدرجة أن نصف چينات الإنسان يحدث فيها الوصل البديل بمتوسط ثلاثة أنواع مختلفة من الـــ mRNA لكل چين من هذه الچينات.

٥- افساد الـــmRNA

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)

حديثاً أمكن تحديد طريقة جديدة لتنظيم ثبات الـــmRNA وتعرف باسم Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) وتعمل هذه الطريقة فى عديد من أنواع الـــmRNAs بما فيها جزيئات الـــmRNAs الناتجة من نسخ الچين الطافر وكذلك جزيئات الـــmRNA التى حدثت بها طفرة أثناء النسخ وأيضاً جزيئات الـــmRNA التى حدث لها وصل (Splicing) خاطىء. وبالإضافة إلى ذلك فإن هذه الطريقة (NMD) تستخدم فى تنظيم تواجد غير الطرز الطافرة من جزيئات الـــmRNAs بوفرة. والآلية التى يحدث بها افساد جزيئات الـــ mRNAs تكون من خلال ثلاثة ممرات مختلفة:

١- إزالة الطرف $5'$ cap من الـــmRNA وتكسير الـــmRNA فى الإتجاه $3' \rightarrow 5'$ بواسطة إنزيمات الـــ Exonucleases.

٢- إزالة الذيل Poly A بالطرف $3'$ من الـــmRNA ثم بعد ذلك تكسيره فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$.

٣- كسر الـmRNA بالقرب من موقع شفرة إنتهاء الترجمة المبكرة (PTC) ويترتب على ذلك تحويله إلى قطعتين واللتان يحدث لهما تكسير فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ تجاه الطرف ($5'$ cap) وفى الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ تجاه الذيل (Poly A tail) فى الطرف $3'$

وتلعب طريقة NMD دوراً هاماً فى تكسير جزيئات الـmRNA التى تحمل طفرات تنتج بروتينات تبدى شكلاً مظهرياً سائداً كما تلعب دوراً هاماً أيضاً فى تنظيم تعبير جزيئات الـmRNA غير الطافرة كما تستخدم كذلك لتنظيم المستويات الصحيحة من التعبير الچينى الطبيعى فى الثدييات فضلاً عن أنها تعتبر عملية أساسية فى تنظيم التعبير الچينى الطبيعى فى الثدييات. ويمكن تلخيص ما سبق فى النقاط التالية:

١. يوجد عديد من الآليات (Mechanisms) المختلفة التى تستخدم لتنظيم التعبير الچينى ما بعد النسخ تشمل استخدام الـmiRNA فى كبت (Repression) الترجمة .

٢. يمكن للبروتينات التى ترتبط بالـmRNA تنظيم تعبيره بازالة الذيل (Poly A tail) مما يؤدى إلى اختزال كفاءة الترجمة وثبات الـmRNA.

٣. الوصل البديل (Alternative splicing) للمنسخ الأولى (hnRNA) يؤدى إلى تكوين جزيئات مختلفة من الـmRNA والتى تنتج بروتينات مختلفة وعلى ذلك فإن تنظيم إنتاج جزيئات مختلفة من الـmRNA من نفس الچين ينظم تعبير الطرز المختلفة من البروتين.

٤. طريقة افساد الـmRNA (NMD) هى العملية التى يتم من خلالها تنظيم تعبير الچين فى كل جزيئات الـmRNAs الناتجة عن الوصل البديل وجزيئات الـmRNAs الطافرة والتى تحتوى على شفرة إنهاء الترجمة المبكرة (PTC) وينتج عن طريقة الـNMD تكسير الـmRNA من الطرف $5'$ وكذلك من الطرف $3'$ أو حدوث كسر داخل الـmRNA.

ثالثاً : تنظيم التعبير الچينى عند مستوى الترجمة

Translational level regulation

إذا أخذنا فى الاعتبار آليات تنظيم التعبير الچينى فإنه من المهم أن نتذكر ان كل آليات التحكم كانت موجهة نحو أظهار تأثيرها على كمية ناتج الچين أو نشاط ناتج الچين. وعند هذه النقطة كان تركيزنا على الآليات التى تتحكم فى كمية الـــmRNA والتى تعتبر أكثر الخطوات أهمية فى تنظيم التعبير الچينى وذلك لانها هى أول خطوة فى التعبير الچينى. فاذا أمكن التحكم فى هذه الخطوة تماماً فإن الخلية لا تفقد طاقتها فى نسخ وترجمة الچينات التى تنتج بعض البروتينات التى لا تحتاجها الخلية فى وقت ما فضلاً عن فقد طاقتها فى تحويل هذا البروتين الناتج إلى الصورة الفعاله وظيفياً. وعلى ذلك فإنه يقصد بتنظيم التعبير الچينى عند مستوى الترجمة هى تلك الآليات التى تمنع ترجمة جزيئات الـــmRNA رغم تواجدها ومنها ما يلى:-

١-عملية الفسفرة (Phosphorylation)

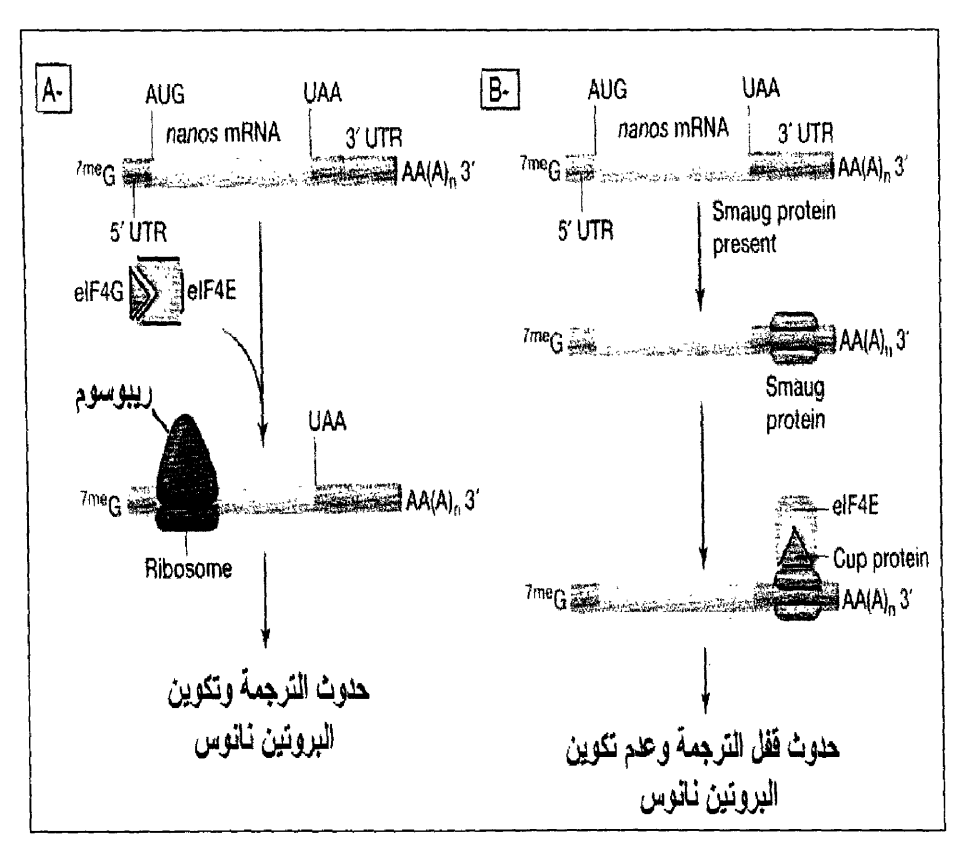
يمكن تنظيم الترجمة بسلوك عام عن طريق تحوير عوامل بداية الترجمة. ومما سبق ناقشنا كيف يؤدى تحوير البروتينات الهستونية وإضافة مجاميع الميثايل للـــDNA فى التأثير على نسخ الچين. وبنفس الطريقة فإن إضافة مجاميع الفوسفات (Phosphorylation) لعامل بداية الترجمة Initiator factors2 (eIF2) فى الكائنات حقيقية النواة سوف يؤثر على آلية الترجمة بصفة عامة.

وعملية فسفرة عامل بداية الترجمة (eIF2) تمنع أول حامض نووى ناقل الذى يحمل الحامض الأمينى ميثونين (Met-tRNA) من الارتباط بالوحدة الريبوسومية الصغيرة (40S). ونظراً لأن هذا التحور يكون موجهاً لكل جزيئات بداية الترجمة (eIF2) فسوف يكون له تأثير عام على الترجمة عن طريق غلق ترجمة كل جزيئات الـــ mRNAs إلى البروتين المناسب. وهذه الآلية تعمل كآليه عامة لتنظيم التعبير الچينى عند مستوى الترجمة.

٢- تنظيم الترجمة عن طريق البروتين نانوس

Regulation of Translation by Nanos Protein

يمكن تنظيم ترجمة جزيئات معينة من الــmRNAs إلى البروتين المناسب. فعلى سبيل المثال فإن تنظيم تكوين البروتين نانوس يحدث عند مستوى الترجمة ففى إناث حشرة الدروسوفيلا يحدث نسخ للــNanos mRNA وتودع فى خلية البيضة (Egg) قبل حدوث الاخصاب. وتتجمع هذه الجزيئات من الــNanos mRNA فى الجزء الخلفى من البيضة حيث يحدث له ترجمة مبكره فى مرحله النمو الجنينى. ووجود الــNanos mRNA فى هذا الموقع الخلفى من البيضة يسمح لها بالتفاعل مع طرازين آخرين من البروتينات التى تنظم الترجمة إلى البروتين نانوس (Nanos). أحد هذه البروتينات هو البروتين Smaug الذى يرتبط بصفة خاصة بالطرف (3′UTR) من الــNanos mRNA ثم بعد ذلك يرتبط به البروتين Cup والذى يرتبط به عامل بداية الترجمة eIF4E فى الكائنات حقيقية النواة (شكل ٥٣). ولكى تبدأ الترجمة فى الكائنات حقيقية النواة يتطلب ذلك تفاعل أو ارتباط كل من البروتين eIF4E والبروتين eIF4G . ونظراً لارتباط البروتين eIF4E بالبروتين Cup واللذان يرتبطان بالطرف (3′UTR) من الــNanos mRNA يجعله غير قادر على التفاعل مع عامل بداية الترجمه eIF4G وبذلك لا تبدأ ترجمة الــNanos mRNA ولقد شوهدت هذه الآليه من كبت ابتداء الترجمة فى أنواع أخرى عن طريق عدم مقدرة ارتباط بروتينات ابتداء الترجمة eIF4E و eIF4G ببعضهما لابتداء ترجمة الــmRNA.



شكل (٥٣): يوضح تنظيم التعبير الجينى عند مستوى الترجمة

A –في غياب البروتين Smaug يتفاعل كل من البروتين eIF4E والبروتين eIF4G وبالتالى يحدث تنشيط لابتداء ترجمة الـــNanos mRNA ومن ثم يتم ترجمتة بواسطة الريبوسوم وينتج البروتين نانوس

B –في وجود البروتين Smaug يرتبط بالمنطقة التى لا تترجم فى الطرف (3′UTR) من الـــ Nanos mRNA وكذلك يرتبط البروتين Cup بالبروتين Smaug ثم يرتبط العامل eIF4E بالبروتين Cup وبذلك لا يتكون مركب ابتداء الترجمة eIF4E – eIF4G ومن ثم يتوقف ترجمة الـــ Nanos Mrna إلى بروتين نانوس Nanos protein

رابعاً : تنظيم التعبير الجينى ما بعد الترجمة

Posttranslational evel regulation

تنظيم التعبير الچينى بعد الترجمة يكون من خلال تحوير البروتين والذى يؤثر على نشاط وموضع وثبات البروتين داخل الخلية من خلال الآليات التالية:

١ – تحوير البروتين (Protein modification)

يمكن تحوير البروتينات بواسطة عديد من الطرق. فالتحورات التى تحدث لبروتينات الهستون تؤثر على تنشيط (Activation) أو كبت (Repression) نسخ الچين. وعلى العكس من ذلك فإن فسفرة البروتين (eIF_2) يغلق ابتداء الترجمة. ويوجد طرازين من التحورات التى تحدث للبروتينات بعد الترجمة وهما:

أ- كسر تتابع الأحماض الأمينية المعروفة باسم التتابع القائد والذى يتركب من ١٥ إلى ٢٥ حامض أمينى الأولى والموجودة بالطرف الذى ينتهى بمجموعة الأمينو الذى يجب أن يكسر إذا كان البروتين سوف يفرز من الخلية أو يدخل هذا البروتين فى الغشاء الخلوى.

ب- إضافة السكريات والدهون إلى البروتينات.

٢- تكسير البروتين (Protein degradation)

الطراز الآخر من تنظيم التعبير الچينى بعد الترجمة يبدو واضحاً وجلياً من خلال ثبات البروتين. فالتكسير السريع لإنزيم ما ينتج عنه فقد فجائى لنشاط هذا الإنزيم وأحد طرز تكسير البروتين تقوم به مجموعة من الإنزيمات المعروفة باسم البروتين Proteases. والطراز الآخر من تكسير البروتين يكون من خلال ارتباط البروتين ابيكتين(Ubiquitin) بالبروتين المراد تكسيره. والابيكتين عبارة عن سلسلة عديدة الببتيد تحتوى على ٧٦ حامض أمينى والتى توجه إلى البروتين لتكسيره من خلال مركب بروتينى كبير يعرف

باسم البروتيوسوم (Proteosome). وتحتوى خلية الإنسان الواحدة عل ما بين ٢٠٠٠٠ إلى ٣٠٠٠٠ وحدة بروتينية من البروتيوسوم.

مقارنة بين تنظيم التعبير الچينى فى البكتيريا والكائنات حقيقية النواة

Comparison Between Gene Regulation In Bacteria And Eukaryoyes

يوجد بعض الأساسيات المتشابهة وكذلك بعض الاختلافات بين البكتيريا والكائنات حقيقية النواة فى تنظيم التعبير الچينى والتشابه بينهما يرجع إلى أن كل منهما يحتوى على بروتينات منشطة (Activators) وبروتينات مكبتة (Repressors) ويمكن تحوير نشاط البروتين الذى يرتبط بالـــDNA وذلك بارتباطه بجزيئات منظمة مساعده. ومع ذلك فالاختلافات بينهما تتلخص فى النقاط التالية:

١- فى الكائنات غير حقيقية النواة تكون المواقع الموجودة بالـــDNA التى يرتبط بها البروتينات متجمعة وقريبة من البروموتور بينما فى الكائنات حقيقية النواة تبعد كل من المعززات (Enhancers) والسيلنسرز (Silencers) عن المنطقة النسخية بمسافة مقدارها ١٠٠٠٠ قاعدة شمال أو يمين الوحدة النسخية.

٢- فى الكائنات حقيقية النواة يوجد عديد من عوامل تنظيم التعبير الچينى بالإضافة للبروموتورات مثل المعززات والسيلنسرز والعازلات وكل هذه العوامل لا توجد فى البكتيريا.

٣- فى الكائنات حقيقية النواة وليس فى البكتيريا تؤثر التحورات التساهمية للبروتينات التى ترتبط بالـــDNA (مثل الفسفرة – إضافة مجاميع الاسيتايل – إضافة مجاميع الميثايل) على نشاط هذه البروتينات وارتباطها بالـــDNA وتنظيم النسخ.

٤- فى الكائنات حقيقية النواة وليس فى البكتيريا إضافة مجاميع الميثايل للـــDNA لها تأثير كبير فى كبت (Repression) النسخ.

٥- فى الكائنات حقيقية النواة يلعب تنظيم الكروماتين دوراً هاماً فى تنظيم التعبير الچينى وغياب الكروماتين فى البكتيريا يستبعد احتمال استخدامه كآلية لتنظيم التعبير الچينى فى البكتيريا.

٦- على الرغم من أن البروتينات التى ترتبط بالــDNA وكذلك الــRNA المضاد المعنى (Antisense RNA) يعتبران من العوامل التى تنظم التعبير الچينى فى كل من البكتيريا والكائنات حقيقية النواة إلا أن الأخيرة تستخدم ايضا الــRNA الدقيق (miRNA) لتنظيم التعبير الچينى من خلال عديد من الآليات المختلفة.

وترجع بعض هذه الختلافات إلى الاختلافات الأساسية البيولوجية بين البكتيريا والكائنات حقيقية النواة ومن أمثلة ذلك هو دور الكروماتين الذى يتواجد فقط فى الكائنات حقيقة النواة وكذلك تداخل كل من عملية النسخ وعملية الترجمة فى البكتيريا والتى هى غير ممكنة فى الكائنات حقيقية النواة وذلك لوجود الغلاف النووى فى الكائنات حقيقية النواة والذى يعتبر حاجز يفصل عملية النسخ عن الترجمة وكذلك الحاجة إلى ارتباط الوحدة الريبوسومية الصغيرة (40S) بالطرف 5′ cap من الــmRNA فى الكائنات حقيقية النواة لتبدأ الترجمة يجعل جزيء الــmRNA متعدد السسترونات(Polycistronic mRNA) غير فعال كآلية لتنظيم التعبير الچينى فى الكائنات حقيقية النواة. وأحد الآختلافات الآخرى تلك الموجودة فى تحويل المنسخ الأولى (hnRNA) إلى جزيء الــmRNA الناضج والذى يترجم إلى البروتين المناسب تسمح بحدوث الوصل البديل (Alternative splicing) وكذلك المحافظة على الذيل (Poly A tail) فى الــmRNA تمثل بعض الآليات المستخدمة فى تنظيم التعبير الچينى فى الكائنات حقيقية النواة وغياب ذلك فى البكتيريا يستبعد هذه الآليات فى تنظيم التعبير الچينى فى البكتيريا.

وباختصار فإن كل من البكتيريا والكائنات حقيقية النواة متشابهان فى النمو إلا أن كل منهما يمتلك آليات (Mechanisms) مختلفة لتنظيم التعبير الچينى ورغم ذلك تظل خاصية مشتركة بينهما وهى أن التعبير الچينى وكذلك البروتينات التى تنتجها هذه الچينات يجب أن ينظم تعبيرها الچينى استجابة للظروف البيئية وحاجة الخلية والكائن.

الباب السابع

الهندسة الوراثية
Genetic Engineering

الهندسة الوراثية أو هندسة الچينات هى العلم التطبيقى للوراثة الجزيئية (Molecular genetics) وهى أحد فروع التقنية الحيوية (Biotechnology) التطبيقية فى مجال علوم الوراثة والذى يرجع إلى التقدم الهائل والكبير الذى حدث فى التعامل بكل براعة ودقة مع النظم البيولوجية لدرجة أنه يمكن القول أن الهندسة الوراثية هى نتاج التقدم التكنولوجى فى التعامل مع النظم البيولوجية بكل براعة ممكنة. والهدف من هندسة الچينات أو الهندسة الوراثية هو محاولة تخليق (Creation) كائنات لها تركيب چينى جديد (New genotypes) وبالتالى شكل مظهرى (New phenotypes) ومثل هذه الكائنات لا توجد فى الطبيعة.

ومما لا شك فيه أن طرق التربية التقليدية للنباتات والحيوانات يمكن أستخدامها لإنجاز هذا الغرض والتى تعتمد على استحداث تراكيب چينية جديدة بإستخدام المطفرات الكيميائية أو باستخدام الأشعة السينية (X-rays) أو الأشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet) متبوعاً بالإنتخاب للصفات المرغوبة ، ولكن استخدام هذه الطرق التقليدية من تربية النباتات غالباً ما يجعل علماء الوراثة وتربية النباتات يعتمدون على الحدوث العشوائى لهذه التراكيب الچينية الجديده من بين عديد من التراكيب الچينية المختلفة والذى غالباً ما يكون عملية معقدة.

وحديثاً تمكن علماء الوراثة الجزيئية وتطبيقاته العملية فى مجال هندسة الچينات أو الهندسة الوراثية من التوصل إلى طريقة عملية تمكن الباحثين من معرفة الكائن الذى يحمل التركيب الچينى المرغوب بطريقة مباشرة وسريعة وهذه الطريقة تعرف بإسم تكنولوچيا الـــDNA المعاد توليفه Recombinant DNA technology (R.D.T.) ومفتاح هذه الطريقة هو

نقل الچين (Gene transfer) أو نقل الچينات بين الكائنات المختلفة بغض النظر عن درجة القرابة بين هذه الكائنات لدرجة أنه يمكن نقل الچينات بين البكتيريا والكائنات الراقية سواء النباتية أو الحيوانية والتى لا يمكن تحقيقها بأى حال من الأحوال باستخدام طرق التربية التقليدية. وتسمى هذه الطرق المتبعة فى نقل الچينات عن طريق تكنولوچيا الــDNA المعاد توليفه بالهندسة الوراثية (Genetic engineering) أو باسم كلونة الچينات (Gene cloning). ولقد ساعدت تكنولوچيا الــDNA المعاد توليفه (R.D.T.) كثيراً من مقدرتنا على معالجة الچينومات (Genomes) المختلفة وأحدثت ثورة علمية فى دراسة تركيب الچينات وتنظيم تعبيرها الچينى ويتركز الأهتمام فى الوقت الحالى لأستخدام تكنولوچيا الــDNA المعاد توليفه (R.D.T.) فى عديد من التطبيقات العملية من بينها ما يلى:

١- عزل چين معين من چينوم (Genome) كائن ما بغرض هدف معين ومحدد.

٢- إنتاج بروتينات معينة وكذلك بعض الهرمونات الهامة بكميات كبيرة وبطريقة اقتصادية.

٣- إنتاج أصناف نباتية جديدة تحمل بعض الصفات الهامة والمرغوبة مثل المقاومة الوراثية لبعض الأمراض النباتية أو المقاومة الوراثية للأفات الحشرية وكذلك المقاومة الوراثية لبعض مبيدات الحشائش التى تستخدم على نطاق واسع فى مقاومة الحشائش.

٤- إنتاج أصناف نباتية جديدة تحتاج إلى كميات قليلة من الأسمدة الكيميائية لزيادة إنتاجها.

٥- تصحيح بعض الأخطاء الوراثية (Genetic defects) والناتجة عن حدوث الطفرات فى الكائنات الراقية ومنها الإنسان.

٦- إنتاج أصناف نباتية جديدة لها أهمية أقتصادية مثل التى تنضج مبكراً أو تلك التى تنتج محصولاً عالياً.

وتتلخص طريقة كلونة الچينات (Gene cloning) بكل بساطة فيما يلى:

١- عزل جزيئات الـــDNA من مصدرين مختلفين بيولوچياً.
٢- تجزئة الـــDNA (الچينوم) من كلا المصدرين بواسطة إنزيم أو أكثر من إنزيمات القطع المحدد Restriction enzymes (R.E.) إلى قطع صغيره من الـــDNA.
٣- إعادة توليف (Recombined) هذه القطع من الـــDNA مرة أخرى مع بعضها بالطريقة التى تمكننا من الحصول على الـــDNA المعاد توليفه الذى يحمل الچين أو الچينات المرغوبة.
٤- إعادة كلونة (Cloning) هذا الـــDNA المعاد توليفه فى خلية عائله لزيادة نسخ هذا الچين المرغوب.

أولاً : عزل الـــ DNA   DNA Isolation

عزل الـــDNA من مصادر مختلفة بيولوچياً تعتبر الخطوة الأولى فى هندسة الچينات، وتتراوح كمية الـــDNA الجافة ما بين ١% من الكمية الكلية لعديد من الكائنات الثديية إلى ٥٠% فى الڤيروسات وغالباً ما يكون هذا الـــDNA مغلفاً بالبروتينات. وفى البكتيريا والخلايا النباتية تتطلب عملية عزل الـــDNA كسر الجدر الخلوية التى تتركب من الكربوهيدرات ونظراً لأن هذا الـــDNA يكون مرتبط بطرز عديدة من البروتينات المختلفة وبالتالى سوف تختلف طريقة عزل الـــDNA من كائن لآخر ومع ذلك توجد خصائص عامة لعزل الـــDNA من الكائنات المختلفة وهى تكسير الجدر الخلوية أو تكسير الخلايا ثم بعد ذلك فصل الـــDNA عن باقى المكونات الخلوية الأخرى من كربوهيدرات وبروتينات ودهون.

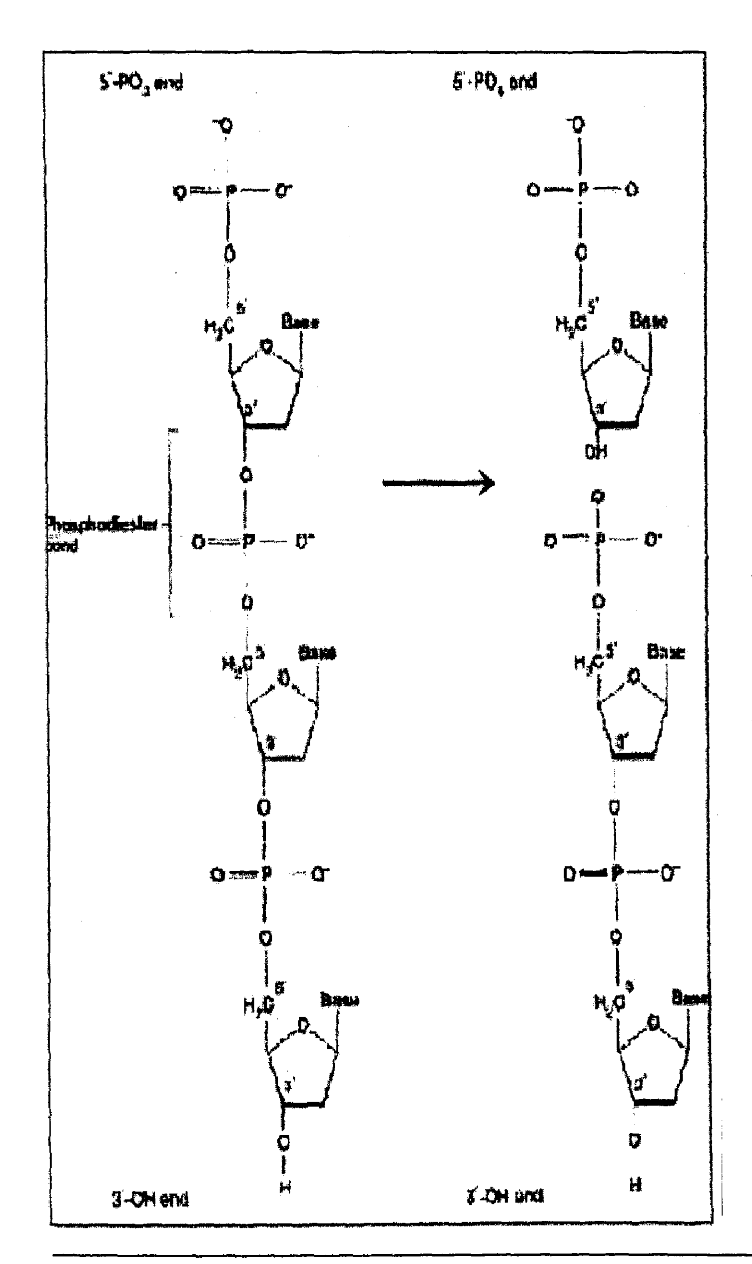
ثانيا : تجزئة أو تقطيع الـــDNA إلى قطع صغيرة

وذلك بكسر الرابطة الفوسفودايستر (Phosphodiester) التى تربط النيوكليوتيدات ببعضها فى خيطى الـــDNA بواسطة قسم خاص من إنزيمات النيوكلييز(Nucleases) والتى منها:

أ- إنزيمات الأندونيوكلييز (Endonucleases) وتقوم هذه الإنزيمات بكسر الرابطة الفوسفودايستر عند مواقع عشوائية داخل التتابع النيوكليوتيدى لخيطى الـــDNA وبالتالى تنتج كسوراً عشوائية.

ب- إنزيمات الاكسونيوكلييز (Exonucleases) وتقوم هذه الإنزيمات بكسر الرابطة الفوسفودايستر الطرفية من خيطى الـــDNA ومن ثم إزالة النيوكليوتيدات الطرفية فقط من خيطى الـــDNA المعاملة بهذا النوع من الإنزيمات.

جـــ-إنزيمات الكسر أو القطع المحدد Restriction enzymes (R.S.) وتقوم هذه الإنزيمات بكسر الرابطة فوسفودايستر بين النيوكليوتيدات عند تتابع محدد معين من النيوكليوتيدات والذى يعرف باسم البالندروم (Palindrome) والذى غالباً ما يكون تتابع قصير من النيوكليوتيدات ويترتب على ذلك تكوين كسور فى خيطى الـــDNA ذات أطرف $3'$-OH وأطراف $5'$-P (شكل ٥٤)، ويختلف هذا البالندروم بإختلاف إنزيمات القطع المحدد (R.E.) وكذلك طبيعة الكسور التى تحدثها فى خيطى الـــDNA ولقد أمكن عزل مئات من هذه الإنزيمات من العديد من الكائنات الدقيقة ويبين جدول (٥) بعض هذه الإنزيمات ومصدرها وكذلك البالندروم الخاص بكل إنزيم منها. والدور البيولوجى لإنزيمات القطع المحدد (R.E.) الموجودة فى خلايا الكائنات الدقيقة هو تحطيمها للـــDNA الأجنبى عندما يدخل الخلية العائله، ومع ذلك كيف تقوم هذه الإنزيمات بهذا الدور حتى تستطيع التمييز بين الـــDNA الأجنبى عن ذلك الـــDNA الخاص بالخلية العائله؟



شكل(٥٤): يوضح كسر الرابطة الفسفودايستر (Phosphdiester) بين النيكليوتيدات فى خيط للـDNA بواسطة إنزيمات القطع المحدد (R.E) Restriction enzymes وتكوين أطراف 3\-OH و 5\-P .

ولقد وجد أن الـــDNA البكتيرى الذى يحمل الجين الذى ينـــتج إنـــزيم مـــا مـــن هـــذه الإنزيمات والذى يهاجم تتابع محدد ومعين من النيوكليوتيدات (البالندروم) لكى يحدث كسور فـــى خيطى الـــDNA يكون مقاوم لتأثير الإنزيم بسبب عدم مقدرة الإنزيم على التعرف علـــى هـــذا البالندروم الخاص به والموجود بالـــDNA للخلية البكتيرية العائله وبالتالى لا يستطيع هذا الإنزيم من إحداث كسور فى خيطى الـــDNA للخلية العائله بينما يقوم بالتعرف على نفـــس البالنـــدروم الموجود فى الـــDNA الأجنبى ومهاجمته وتحطيمه أو تكسيره. ويرجع ذلك إلى أن البالنـــدروم الموجود فى الـــDNA البكتيرى يضاف إلى أحد النيوكليوتيدات به مجموعة ميثايل ممـــا يجعلـــه مقاوم لتأثير إنزيم القطع المحدد (.R.E) وتنقسم طبيعة الكسور التى تحدثها هذه الإنزيمات إلى ما يلى:

١- إحداث كسور فى مناطق متناظره من البالندروم حيث يقوم الإنزيم بكسر الرابطة الفوسفودايستر فى خيطى الـــDNA عند مناطق متناظره من البالندروم منتجاً قطع من الـــDNA ذات أطراف $3'$-OH وأطراف $5'$-P تعرف بالقطع ذات الأطراف العمياء Blunt- ends (شكل ٥٥).

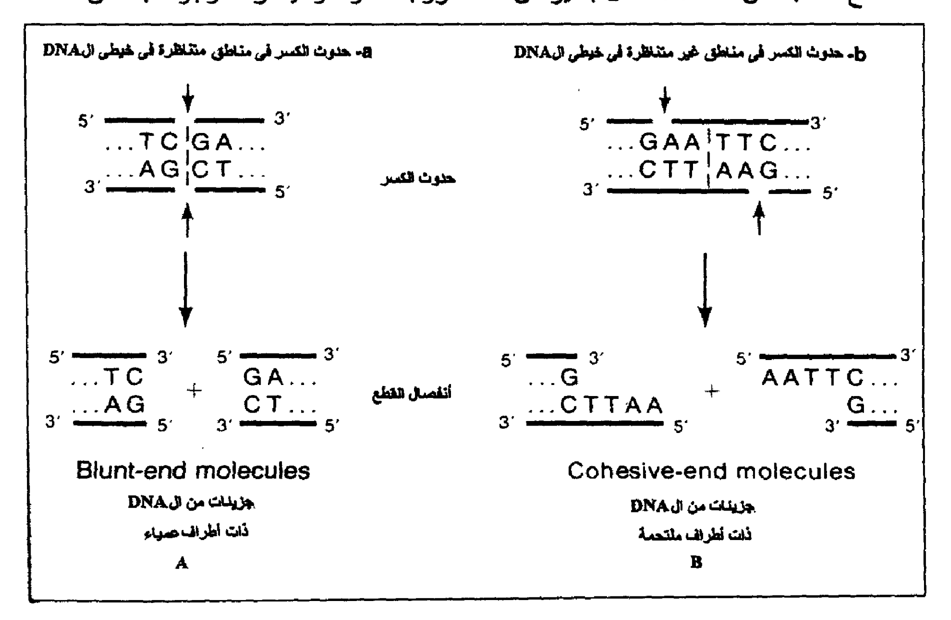
٢- إحداث كسور فى مناطق غير متناظرة من الباندروم حيث يقوم الإنزيم بكسر الرابطة الفوسفودايستر فى خيطى الـــDNA عند مناطق غير متناظرة من البالندروم منتجاً قطعاً من الـــDNA أطرافها غير متساوية فى الطول وهذه الأطراف إما تحتوى على $3'$-OH أو تحتوى على $5'$-P وتسمى هذه الأطراف بالأطراف المُلتحمه (Cohesive ends) وتتميز هذه الأطراف بأنه عندما يقرأ التتابع النيوكليوتيدى عند مناطق الكسر فى الإتجاه $3' \longrightarrow 5'$ يكون هونفس التتابع فى خيطى الـــDNA عند مناطق الكسر (شكل٥٥) . ومعظم إنزيمات القطع المحدد (.R.E) يتعرف كل إنزيم منها على البالندروم الخاص به بغض النظر عن مصدر هذا الـــDNA. وعلى ذلك فإن قطع الـــDNA الناتجة من تجزئة أو تقطيع الـــ DNA بنفس الإنزيم (.R.E) سوف يكون لها نفس النهايات من التتابع

النيوكليوتيدى وخاصة تلك التى تنتج أطراف ملتحمة (Cohesive ends) والتى تعتبر أحد النقاط الهامة فى تكنولوجيا الـــDNA المعاد توليفه (R. D. T).

Name of enzyme	Microorganism	Target sequence and cleavage sites
Generates cohesive ends		
EcoRI	*E. coli*	G↓A A T T C C T T A A↑G
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	G↓G A T C C C C T A G↑G
HaeII	*Haemophilus aegyptius*	Pu G C G C↓Py Py↑C G C G Pu
HindIII	*Haemophilus influenza*	A↓A G C T T T T C G A↑A
PstI	*Providencia stuartii*	C T G C A↓G G↑A C G T C
TaqI	*Thermus aquaticus*	T↓C G A A G C↑T
Generates blunt ends		
BalI	*Brevibacterium albidum*	T G G↓C C A A C C↑G G T
SmaI	*Serratia marcescens*	C C C↓G G G G G G↑C C C

جدول(٥) : بعض إنزيمات الـــRestriction enzymes ومصادرها والبالندروم (Palindrome) الخاص بها ومناطق الكسر التى تحدثها هذه الإنزيمات سواء تلك التى تنتج الأطراف الملتحمة (Cohesive ends) أو تلك التى تنتج الأطراف العمياء (Blunt ends) ويلاحظ أن الأسهم تشير إلى مكان كسر الرابطة الفسفودايستر فى كلا خطي الـــDNA.

وحيث أن معظم هذه الإنزيمات (.R.E) تتعرف على تتابع نيوكليوتيدى فريد (البالنـــدروم) فإن عدد قطع الــDNA الناتجة من تجزئة الــDNA يكون محدداً. ففـــى البكتيريـــا *E .coli* فـــإن الچينوم البكتيرى (DNA) الذى يحتوى على ٣ × ١٠^٧ زوج من النيوكليوتيدات سوف يتجزأ إلـــى قطع صغيرة من الـــDNA يتراوح عددها ما بين مئات إلى آلاف من القطع تبعـــاً لنـــوع الإنـــزيم المستخدم بينما چينومات (DNA) الثدييات سوف تتجزأ أو تقطع إلى أكثر من مليون قطعـــه عنـــد إستخدام نفس الإنزيم (.R.E) الذى استخدم فى تجزئة چينوم (DNA) البكتيريا ومع ذلك سوف يظل عدد القطع الناتجة من الـــDNA أقل بكثير من عدد الروابط الفوسفودايستر الموجوده بالكائن.



شكل(٥٥) يوضح طرز كسر مناطق البالندروم بواسطة إنزيمات الــ(.Restriction enzymes (R.E

a– حدوث كسر الروابط الفسفودايستر فى كلا الخطين الـــDNA فى مناطق متناظرة من البالندروم منتجاً أطراف ذات نهايات 3'–OH وأطراف ذات نهايات 5'-P مكوناً جزيئات أو قطع ذات أطراف عمياء (Blunt ends).

b– حدوث كسر الروابط الفسفودايستر فى كلا خيطي الـــDNA فى مناطق غير متناظرة من البالندروم منتجاً قطع من الـــDNA ذات أطراف مختلفة فى الطول وذات نهايات 3'–OH وأطراف ذات نهايات 5'-P منتجاً قطع من الـــDNA ذات الأطراف الملتحمة (Cohesive ends).

وبوجه خاص فإن جزيئات الـــDNA الصغيره أو الچينومات الصغيره مثل الڤيروسات (Viruses) والبلازميدات (Plasmids) تحتوى ما بين واحد إلى عشرة مواقع تعرف (البالندروم) تتعرف عليها إنزيمات القطع المحدد (R.E.) ولكن البلازميدات التى تحتوى على موقع تعرف واحد والذى يتعرف عليه أحد هذه الإنزيمات (R.E.) تكون أكثر فائدة فى استخدامها كحاملات (Vector) للچين المنقول (T.G.) Transgene.

ثالثاً : وصل (joining) قِطَعْ الـــDNA أو الچين المنقول بالحامل (Vector) المناسب

فى مجال هندسة الچينات يتم وصل قطعة الـــDNA التى تحمل الچين المنقول (T.G.) بقطعه أخرى صغيره من الـــDNA تكون قادره على التضاعف الذاتى والتى تعرف بحامل الكلونه (Cloning vector). وعموماً تستخدم البلازميدات البكتيريه كحاملات للچينات المنقوله وتكوين ما يعرف بالبلازميد المعاد توليفه(.Recombinant plasmid(R.P والذى يتركب من البلازميد البكتيرى بالإضافة إلى الچين المنقول (T.G.) Transgene وبعض العناصر الأخرى التى سوف نتناولها فيما بعد.

رابعاً : كلونة الچين المنقول Cloning Transgene

أبسط طريقة لكلونة الچين المنقول أو لكونة چين ما هى طريقة التحول البكتيرى (Bacterial transformation) حيث تستخدم البكتيريا لإكثار (Cloning) الچين المنقول (T.G.) وكذلك للكشف عن تواجده فى الخليه البكتيرية المتحوله وراثياً وذلك بادخال البلازميد البكتيرى المعاد توليفه (R.P.) وما يحمله من الچين المنقول (T.G.) داخل الخلية البكتيرية العائلة (شكل٥٦) خلال الخطوات التالية:

١- عزل قطعه من الـــDNA من چينوم الضفدع (Frog) على سبيل المثال بعد تجزئة الچينوم بأحد إنزيمات القطع المحدد (R.E.) وكذلك عزل بلازميد بكتيرى وكسره بواسطة نفس إنزيم الـــقطع المحدد (R.E.).

٢- تكوين البلازميد المعاد توليفه (R.P.) عن طريق إضافة قطعة الـــDNA المأخوذه من چينوم الضفدع إلى البلازميد البكتيرى المكسور.

٣- إحداث التحول الوراثى البكتيرى بإضافة البلازميد البكتيرى المعاد توليفه (R.P.) إلى خلية بكتيرية عائله ثم أنتخاب الخلايا البكتيرية العائله التى تحتوى على البلازميد المعاد توليفه وما يحمله من الچين المنقول باستخدام طرق الانتخاب المتبعة فى ذلك والتى سوف نتناولها بالتفصيل فيما بعد.

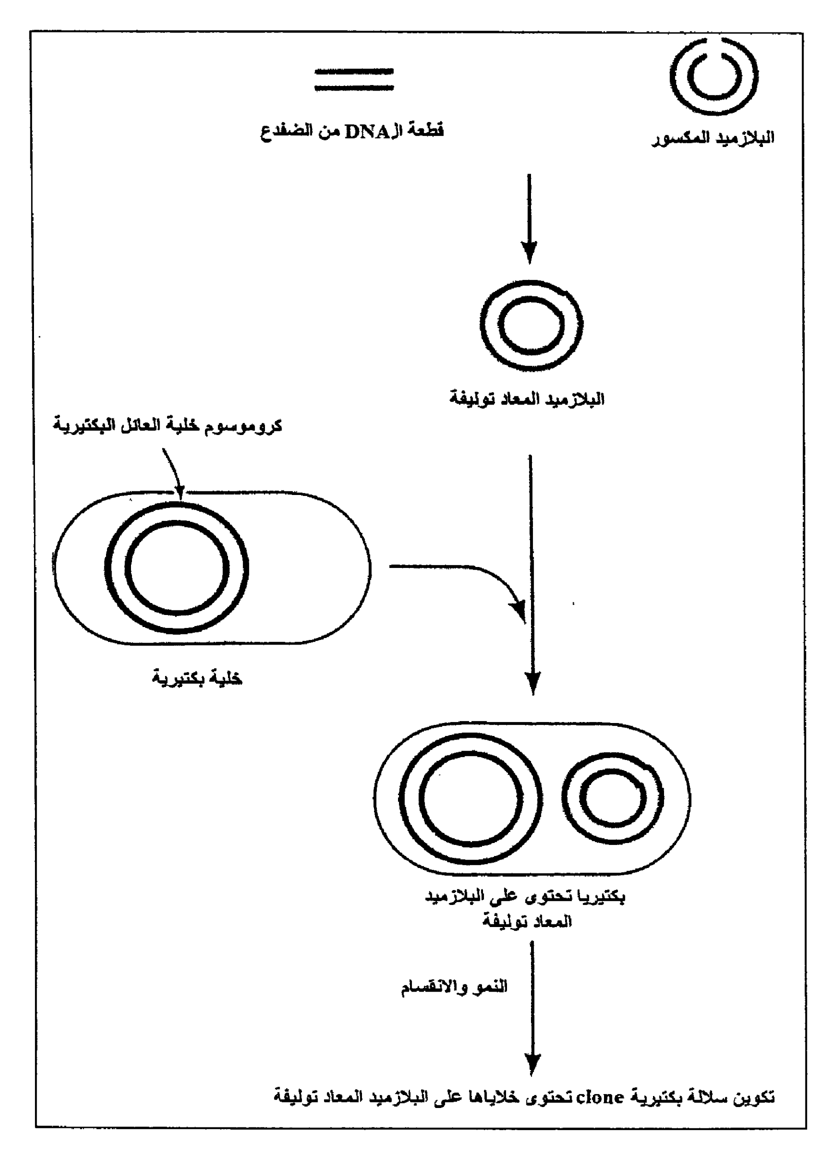
٤- تنمية الخلايا البكتيرية المكلونه بالبلازميد المعاد توليفه وما يحمله من الچين المنقول على البيئة الغذائية المناسبة للحصول على سلالة مكلونه (Bacterial clone) تحمل الچين المنقول وهذه السلالة البكتيرية لا تتواجد فى الطبيعة.

وصل قِطَعْ الـــ DNA Joining DNA Fragments

أ- وصل قطع الـــDNA ذات الأطراف الملتحمة(Joining fragments with cohesive ends)

يمكن لقطعتين من الـــDNA المأخوذة من مصادر بيولوجية مختلفة والناتجـــة مـــن معاملـــة الچينومين المختلفين بنفس إنزيم القطع المحدد (R.E.) والتى تكون قطع ذات أطراف ملتحمـــة أن ترتبط ببعضها عن طريق الاقتران بين أزواج القواعد المكملـــة (Complementary bases) عنـــد هذه الأطراف كما هو مبين فى (الشكل ٥٧) على النحو التالى:

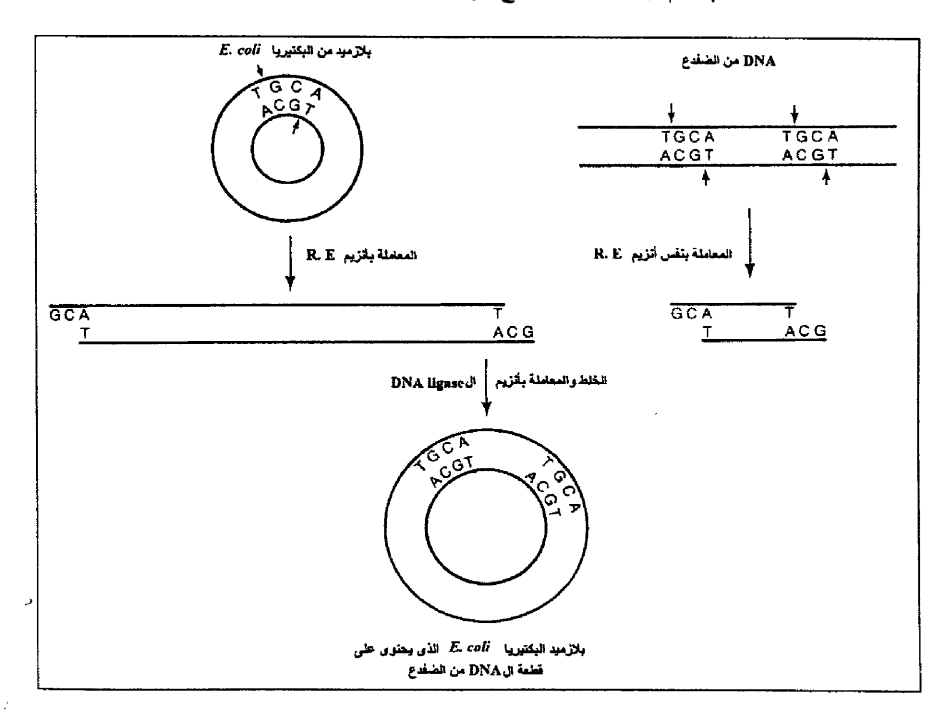
١- معاملة قطعة الـــDNA المأخوذة من الضفدع بأحد إنزيمات القطع المحدد (R.E.) التـــى تسبب كسور فى خيطى الـــDNA مكوناً أطراف فى خيطى الـــDNA عند منطقة الكسر ذات أطراف ملتحمة ويجب ملاحظة أن هذا النوع من الإنزيمات المستخدمه هـــى مـــن طراز الإنزيمات تحدث كسوراً عند مناطق غير متناظره فى البالندروم فى كلا خيطـــى الـــDNA وكذلك معاملة البلازميد البكتيرى بنفس الإنزيم.



شكل(٥٦) : خطوات كلونه الچين (Gene cloning)

٢-خلط ناتج الخطوة السابقة معاً لوصل القطعتين معاً من الــDNA عن طريق الاقتران بين أزواج القواعد المكملة عند الأطراف ذات الأطراف الملتحمة وفى وجود إنزيم DNA ligase الذى يقوم بتكوين الرابطة فوسفودايستر فى مناطق الفجوات (Gaps) الموجوده بالأطراف المكسوره من خيطى الــDNA.

٣-تكوين البلازميد المعاد توليفه (R.P.) الذى يتركب من البلازميد وقطعه الــDNA المأخوذ من چينوم (DNA) الضفدع (Frog).



شكل(٥٧) : يوضح بناء وتكوين بلازميد (Plasmid) معاد توليفه (R.P) يحمل قطعة من الــDNA من الضفدع ذات الأطراف الملتحمة بعد معاملة كل من قطعة الــDNA المأخوذة من الضفدع وكذلك البلازميد البكتيري بنفس إنزيم القطع المحدد (.R.E) والذي يحدث كسوراً ذات أطراف ملتحمة وتوضح الأسهم القصيرة مكان حدوث الكسر فى البالندروم فى كل من الــDNA المأخوذ من الضفدع (Frog) والبلازميد البكتيري.

ب- وصل قِطَعْ الـــDNA ذات الأطراف العمياء

(Joining DNA fragment with blind-ends)

يمكن لقطع الـــDNA ذات الأطراف العمياء والناشئة من معاملة الـــDNA باى من الإنزيمات التى تحدث كسوراً فى البالندروم عند مناطق متناظرة من خيطى الـــDNA باستخدام الطرق التالية:

١- الطريقة المباشرة (Direct method)

يستخدم فى هذه الطريقة المباشرة إنزيم DNA ligase والذى ينتجه الفيرس T4 عند تكاثره داخل البكتيريا العائلة *E. coli* ويختلف هذا الإنزيم عن باقى إنزيمات الـــ DNA ligase الأخرى فى أنه يقوم بلحم seals الكسور الموجودة فى الخيط المفرد للـــDNA مزدوج الخيط وكذلك يمكنه أيضاً أن يقوم بوصل قطع الـــDNA ذات الأطراف العمياء.

٢- طريقة وصل الذيل المتجانس: (Homopolymer tail joining)

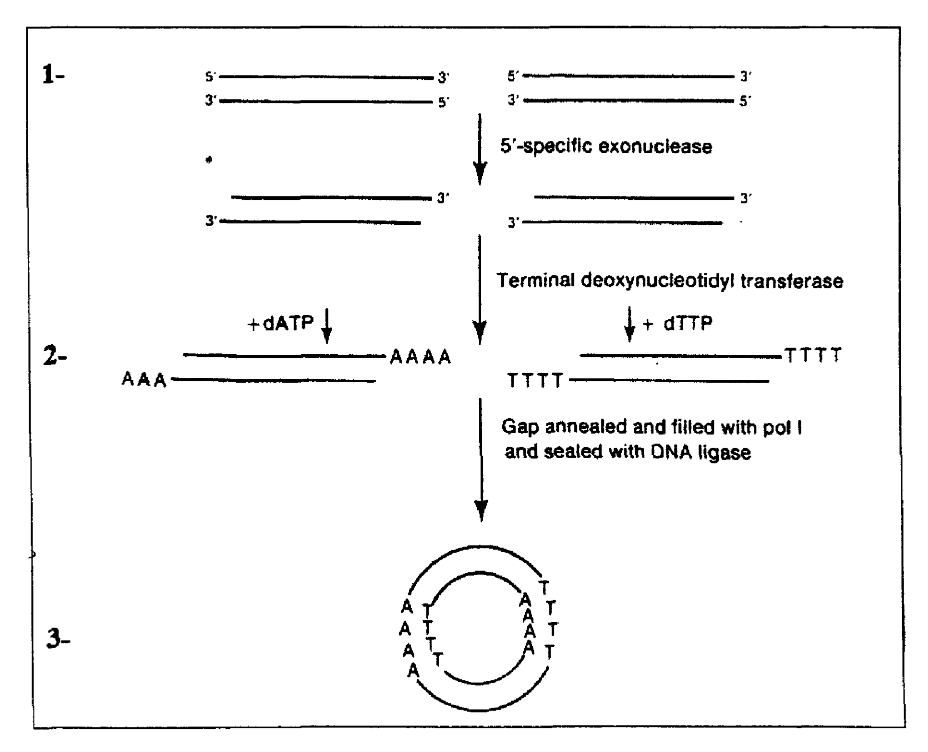
وفى هذه الطريقة يستخدم إنزيم بلمرة الـــ DNA (DNA polymerase) غير عادى يمكن الحصول عليه من نسيج حيوانى حيث يقوم هذا الإنزيم بإضافة النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات للطرف $3'$-OH لقطع الـــ DNA المفرده الخيط دون الحاجة إلى وجود خيط الـــDNA المطبعى وتتلخص هذه الطريقة فيما يلى (شكل ٥٨):

١- معاملة جزىء الـــDNA بإنزيم $5'$-Specific exonuclease لإزالة عدد قليل من النيوكليوتيدات الطرفية من الطرف $5'$ من كلا خيطى الـــ DNA.

٢- معاملة قطع الـــDNA الناتجة من الخطوة السابقة بإنزيم الـــ Terminal deoxyribonucletide transferase وفى وجود طراز واحد من النيوكليوتيدات مثل dTTP فسوف يحدث إضافة العديد من الـــdTTP إلى الطرف $3'$-OH فى كلا خيطى الـــDNA مكونة ما يعرف بالذيل (Poly dT tail) وإذا استخدم نيوكليوتيدات الأدينين فسوف

يحتوى على العديد من نيوكليوتيدات الأدينين (Poly dA tail) فى الطرف $3'$-OH وعلى ذلك يمكن وصل جزيئين من الـDNA ببعضهما إذا وضع الذيل (Poly dT tail) فى أحد الخيطين ووضع الذيل (Poly dA tail) فى الخيط الآخر.

٣- تملأ الفجوات gaps فى الجزيء المتصل بالمعاملة بإنزيم بلمرة الـ DNA وغالباً يستخدام إنزيم بلمرة الـDNA المستخلص من البكتيريا *E. coli* وهو إنزيم polymerase *E. Coli* ويتم لحم الفجوات المتبقية فى خيوط الـDNA المفرده بواسطة إنزيم الـDNA ligase. وهذه الطريقة هى طريقة عامة لوصل قطع من الـDNA ببعضها.



شكل(٥٨): يوضح وصل خيوط من الـDNA ذات الذيل المتجانس

(Complementary homopolymer tails)

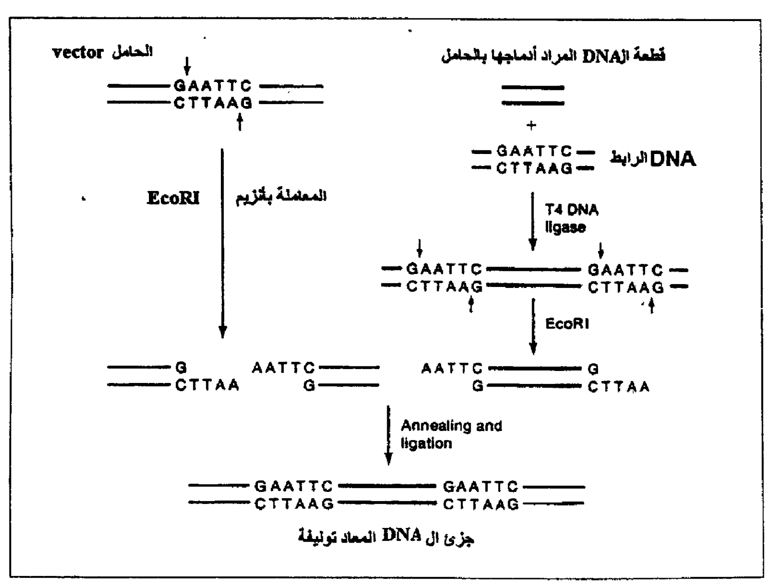
ج- وصل قطع من الـــ DNA ذات أطراف ملتحمة بأخرى ذات أطراف عمياء

وتعرف هذه الطريقة باسم الرابط (Linker) يمكن إجراء هذه الطريقة بإتباع الخطوات التاليه (شكل٥٩):

١- فى هذه الطريقة يتم تخليق قطعه من الـــDNA عديد النيوكليوتيدات تتركب من تتابع معين من النيوكليوتيدات والذى يمثل البالندروم الموجود بالحامل (Vector) والذى يتم كسره بواسطة أحد إنزيمات الـــR.E. والتى تحدث أطراف ملتحمه .

٢- يستخدم إنزيم الـــT4 DNA ligase فى ربط قطعة الـــDNA عديدة النيوكليوتيدات (الرابط) بقطعة الـــDNA المراد ربطها بالحامل (Vector).

٣- معاملة كل من الحامل وناتج الخطوة السابقة بنفس إنزيم القطع المحدد (R.E.) مثل إنزيم الـــ EcoR1 لإحداث كسور فى نفس البالندروم فى كلاهما عند مناطق غير متناظره مكوناً أطراف ملحمه (Choessive-ends) وبذلك سوف تتكون أطراف ذات قواعد مكملة فى كلاهما وبالتالى يصبح ممكناً وصلهما وتكوين الـــDNA المعاد توليفه.



شكل(٥٩) يوضح استخدام الرابط (Linker) فى تكوين الـــDNA المعـاد توليفه. وتشير الأسهم الرأسية إلـى مكـان الكسور داخـل البالندروم فى مناطق غير متناظرة مـن خيطي الـــDNA.

إنتخاب البلازميد المعاد توليفه Selection of Recombinant Plasmid (R.P.)

عند معاملة الحاملات (Vector) أو البلازميدات البكتيرية بإنزيم ما من إنزيمات القطع المحدد (R.E.) وكذلك معاملة چينوم (DNA) كائن ما بنفس الإنزيم وخلطها معاً للحصول على بلازميدات معاد توليفها (R.P.) فسوف يتكون عديد من طرز هذه البلازميدات المعاد توليفها التالية:

١- بعضها لا تحمل أى قطعة من الـــDNA الأجنبى أو الچين المنقول (T.G.).

٢- بعضها يحمل قطعة من الـــDNA الأجنبى أو الچين المنقول (T.G.).

٣- البعض الآخر يحمل عديد من قطع الـــDNA الأجنبى أو الچين المنقول (T.G.). وهذا الطراز الأخير لا يستقر داخل الخلية البكتيرية العائلة لأنه غالبا ما ينقصها منطقة منشأ التضاعف وكذلك الچينات المسئولة عن تضاعفه وبالتالى فإنها تعتبر ليست ذات أهمية.

وعلى ذلك فإنه لتسهيل عزل البلازميد المعاد توليفه (R.P.) والذى يحمل الچين المنقول (T.G.) فإنه يجب استخدام وسائل تحقق هذا الهدف والتى يوجد العديد منها من الناحية العملية منها طريقة التحول البكتيرى التاليه :

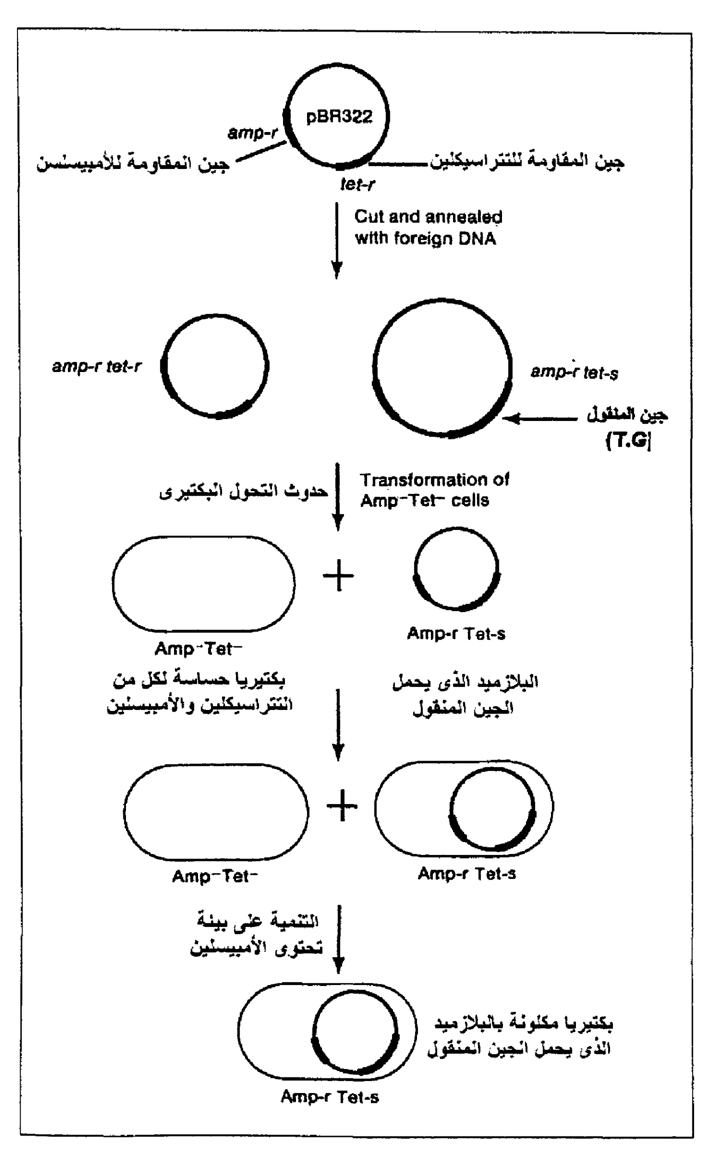
طريقة التحول البكتيرى Bacterial transformation

وتعرف هذه الطريقة باسم التحول البكتيرى بمساعدة كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) (شكل٦٠) والهدف الأساسى لهذه الطريقة هو عزل البكتيريا التى تحتوى على البلازميد المعاد توليفه (R.G.) من بين المستعمرات البكتيرية العديدة والنامية على البيئة الغذائية. وتتضمن هذه الطريقة أن يحتوى البلازميد المعاد توليفه على:

١- الچين المنقول (T.G.) Transgene.

٢- الچين المخبر (R.G.) Reporter gene للكشف عن الچين المنقول وغالباً ما يكون چين المقاومة لأحد المضادات الحيوية.

٣- بعض العناصر الأخرى الضرورية والتى سوف نتناولها بالتفصيل فيما بعد.



شكل (٦٠) : يوضح طريقة البلازميد PBR322 وكلونته وما يحمله من الچين المنقول (T.G.) فى بكتيريا حساسة لكل من المضاد الحيوي التتراسيكيلين والأمبيسلين Amp^{-} Tet^{-} والحصول على بكتيريا مكلونة (Bacterial clone) بالبلازميد المعاد توليفه (R.P.) بالچين المنقول (T.G.)

ومن البلازميدات البكتيرية المفيدة والتى تستخدم فى هذا الغرض البلازميد المعروف باسم pBR322. وهو بلازميد صغير يتركب من ٤٣٦٢ زوج من النيوكليوتيدات ويحتوى على چين المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين (Tet-r) وچين المقاومة للمضاد الحيوى الامبيسلين (Amp-r) ويستخدم هذا البلازميد بادخال الچين المنقول (.T.G) داخل چين المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين (Tet-r) لاحتوائه على بالندروم لأحد إنزيمات القطع المحدد (شكل ٦٠) وبذلك يصبح چين المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين حساس له(Tet-s).

ويستخدم هذا البلازميد pBR322 المعاد توليفه بالچين المنقول (.T.G) فى انتخاب البكتيريا التى تحتوى عليه بتنميتها على بيئة غذائية تحتوى على المضاد الحيوى الامبيسلين حيث يضاف البلازميد المعاد توليفه (.R.P) السابق إلى بكتيريا حساسه لكل من المضاد الحيوى التتراسيكلين والامبيسلين (Tet-s Amp-s) وفى وجود أيونات كلوريد الكالسيوم يحدث ادخال لهذا البلازميد المعاد توليفه بالچين المنقول إلى البكتيريا الحساسه لكلا المضادين الحيوين السابقين ثم بعد ذلك يضاف المضاد الحيوى الامبيسلين إلى البيئة الغذائية وبالتالى تؤدى هذه المعاملة إلى موت الخلايا التى لم تحصل على البلازميد المعاد توليفه (.R.P) بينما تعيش وتستمر فى النمو البكتيرى التى حصلت البلازميد المعاد توليفه مكونة مستعمرة بكتيرية جميع خلاياها تحتوى على البلازميد المعاد توليفه وما تحمله من الچين المنقول (.T.G) وتسمى هذه البكتيريا بالكتيريا المكلونة (Bacterial clone) بالچين المنقول (.T.G).

كلونة البكتيريا بچينات الكائنات حقيقية النواة

أولاً: طريقة الـــ c-DNA   c-DNA method

فى كل من الكائنات حقيقية النواة وغير حقيقية النواة يحدث انتخاب البلازميد أو الحامل (Vector) الذى يحمل چين معين بطريقة غير مباشرة. ومن الناحية النظرية من السهل التحقق من وجود چين ما من خلال تعبيره الچينى والذى ينتج شكلاً مظهرياً (Phenotype) معيناً ، ومع ذلك فإن كل چينات الكائنات حقيقية النواة لا تنتج مثل هذا الشكل المظهرى الذى يمكن التحقق من

خلاله على وجود الچين وكذلك فإنه بالنسبة للچينات حقيقية النواة فإن الچين الذى تم وصله ببلازميد بكتيرى معين وتكوين بلازميد معاد توليفه (R.P.) قد يفشل هذا الچين فى التعبير الچينى داخل الخلية البكتيرية المكلونه بهذا الچين لعديد من الأسباب من بينها:

١- قد لا يحدث نسخ لهذا الچين فى الخلية البكتيرية العائله.

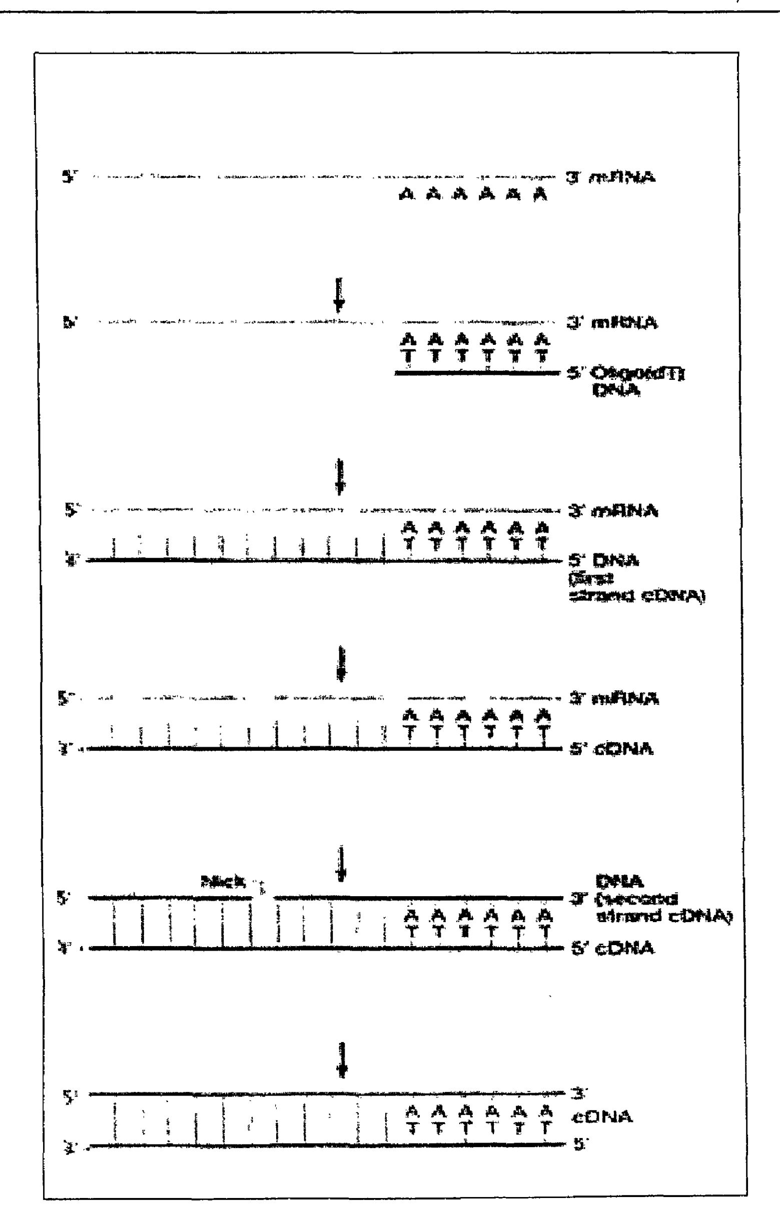
٢- وإذا حدث له نسخ فإنه قد تفشل ترجمة الـــmRNA للبروتين المناسب وذلك لأسباب عديدة سوف نتناولها بالتفصيل فيما بعد.

وللتغلب على هذه العقبات التى تواجه التعبير الچينى للچينات حقيقية النواة عند كلونتها (Cloning) فى البكتيريا العائله تستخدم طريقة تخليق الچين صناعياً باستخدام النسخ العكس (Reverse Transcription) لجزيئات الـــmRNA الناضجة والمعزولة من خلايا الكائنات حقيقية النواة. فإذا افترضنا أننا نرغب فى كلونه (Cloning) چين من الدجاج وهو چين إنتاج بروتين أوڤالبيومين (Ovalbumin) فى بلازميد بكتيرى فإن ذلك لا يتطلب معرفة التتابع النيوكليوتيدى لهذا الچين ولكن يتطلب تكوين بلازميد معاد توليفه (R.E.) يحمل هذا الچين والذى يتم بمعاملة كل من البلازميد البكتيرى والـــDNA المعزول من خلايا الدجاج بنفس إنزيم القطع المحدد (R.E.) ثم بعد ذلك تجرى الخطوات السابقة الذكر والتى تؤدى فى النهاية إلى حدوث التحول الوراثى البكتيرى بواسطة هذا البلازميد المعاد توليفه (R.P.) وما يحمله من چين إنتاج بروتين الاوڤالبيومين ومع ذلك فإن تحديد المستعمره البكتيرية التى تحتوى على هذا البلازميد المعاد توليفه (R.P.) لا يمكن إنجازه وذلك لأن الخلايا البكتيرية العائلة لا تستطيع تخليق هذا البروتين لإحتواء هذا الچين على الانترونات (Introns) وأن البكتيريا العائلة لا تحتوى على الإنزيمات اللازمة لإزالة الانترونات وتجميع الاكزونات (Exrons) من الـــhnRNA الناتج وتكوين الـــ(mRNA) الناضج الذى يجب ترجمته بواسطة الريبوسومات البكتيرية إلى بروتين الاوڤالبيومين. لذلك يجب البحث عن وسيلة أخرى لأكتشاف الخلايا البكتيرية المكلونه والمرغوبه مثل تهجين الـــDNA البكتيرى مع أى من المنسخ الأولى (hnRNA) أو مع الـــmRNA الناضج والناتجين من نسخ چين الاوڤالبيومين والمعزول من خلايا الدجاج ، ولكن نظراً لأن الخلايا البكتيرية العائلة المكلونة بالچين تكون بمعدل خلية بكتيرية واحدة لكل 10^7 خلية بكتيرية فلذلك تعتبر هذه الطريقة مملة ومن ثم تستخدم طريقة

الـ c-DNA ونظراً لأن بعض طرز الخلايا الحيوانية مثل تلك التى تنتج بروتين الاوڤالبيومين تقوم بتخليق نوع واحد من البروتينات الخلوية أو عدد قليل من أنواع البروتينات المختلفة فإنه يمكن عزل جزيئات mRNA الناضجة والخاليه من الأنترونات من سيتوبلازم هذه الخلايا حيث تمثل جزيئات الـmRNA الغالبية العظمى من الـRNA الخلوى الموجود بالسيتوبلازم ومن ثم فإن عينات الـmRNA النقية عادة ما تحتوى على نوع واحد من جزيئات الـmRNA المعزولة والنقية من الخلايا الحيوانية والتى سوف تترجم إلى بروتين الاوڤالبيومين ، وعلى ذلك فإن الچينات التى من هذا الطراز والتى تنتج معظم البروتين الخلوى يكون من السهل كلونتها (Cloning) بالبكتيريا العائله حيث تعمل جزيئات الـmRNA المستخلصة والنقية من هذه الخلايا الحيوانية كنقطة بداية لتخليق أو تكوين مجموعة من البلازميدات البكتيرية المعاد توليفها (R.P.) والتى يحتوى العديد منها على چين واحد فقط من الچينات المرغوبة.

والعديد من الڤيروسات الحيوانية المعروفة باسم الرتروڤيروسات (Retroviruses) التى مادتها الوراثية هى الـRNA وعوائلها هى الخلايا الحيوانية والتى تسبب أوراماً فى الحيوانات تحتوى هذه الڤيروسات على إنزيم النسخ العكسى (Reverse transcriptase) داخل الجزيئات الڤيرسية ، ويتميز هذا الإنزيم بأنه يمكنه أن يستخدم الخيط المفرد من الـRNA كخيط مطبعى (Template) (مثل الـmRNA) وبآليه غير مفهومه تماماً يستطيع هذا الإنزيم تخليق نسخة مزدوجة الخيط من الـDNA تعرف باسم c-DNA فإذا كان هذا الخيط المطبعى هو عباره عن خيط الـ mRNA الناضج والخالى تماماً من الأنترونات فإن جزىء أو الخيط المزدوج من الـDNA الناتج (c-DNA) سوف يحتوى على الأكزونات فقط والتى تمثل التتابع النيوكليوتيدى الشفرى اللازم لتكوين البروتين المناسب (شكل ٦١).

وإذا كان الغرض من تكوين البلازميد المعاد توليفه باستخدام الـc-DNA هو استخدام البكتيريا كخلايا عائله لإنتاج نشاط چين من چينات الكائنات حقيقية النواة فإنه يمكن الحصول على هذا البلازميد المعاد توليفه (R.P.) بالچين المرغوب c-DNA باستخدام طريقة وصل قطع الـDNA ذات الأطراف العمياء سابقة الذكر وغالباً ما يستخدم طريقة الرابط (Linker) لهذا الغرض.



شكل (٦١) يوضح خطوات تخليق الــ c-DNA من الــmRNA

ثانياً : طريقة الجينات المخلقة صناعياً The use of synthetic genes

تنتج الكائنات الراقية مثل الإنسان عديد من الهرمونات التى تتركب من سلاسل عديدة الببتيد (Polypeptide chains) والتى لها أهمية طبية عظيمة ومثل هذه الهرمونات قد يتركب بعضها من عدد قليل من الأحماض الأمينية. وفى معظم الحلات يكون من الصعب عزل الچين الذى ينتج هرمون ما من هذه الهرمونات فضلاً عن أنه من الصعب عزل جزيئات الــmRNA التى تترجم إلى أى من هذه الهرمونات.

و نظراً لأنه أصبح معروفاً بكل دقة تتابع الأحماض الأمينية فى السلسلة عديدة الببتيد لعديد من هذه الهرمونات وبالتالى معرفة التتابع النيوكليوتيدى الذى يمثل الشفرات اللازمة للتعبير عن هذه الأحماض الأمينية، وكذلك أمكانية تخليق قطع من الــDNA الصغيرة معملياً ذات تتابع نيوكليوتيدى معروف، فإنه من الممكن عملياً تخليق الشفرات اللازمة للتعبير عن هرمون ما من هذه الهرمونات. ولكى تكون هذه الچينات المخلقة صناعياً فعاله وظيفياً يجب أن يبدأ تتابعها النيوكليوتيدى بشفرة بداية نسخ الچين (Initiation codon) وكذلك يجب أن تنتهى بتتابع نيوكليوتيدى يحدد إنهاء نسخ الچين أو شفرة توقف الاستمرار فى النسخ (Stop codon) ، ومن ثم فإنه بمجرد تخليق الچين صناعياً بالصورة السابقة يمكن وصله بالبلازميد المناسب بأى طريقة من طرق وصل قطع الــDNA سابقة الذكر وحتى وقتنا الحالى فإن أكبر چين أمكن تخليقه صناعياً بهذه الطريقة هو چين الإنتروفيرون (Interferon) وهو الذى ينتج بروتين الإنتروفيرون (المضاد لنشاط الڤيروسات) حيث يتركب هذا الچين من ٥١٠ زوج من النيوكليوتيدات والتى تمثل الشفرات اللازمة والكافية للتعبير عن الأحماض الأمينية الموجودة فى بروتين الإنتروفيرون والتى يبلغ عددها ١٧٠ حامض أمينى.

إنشاء مكتبة الجينات Constructing A library of Genes

تستخدم مكتبة الچينات فى الأغراض التالية:

١- إكتشاف چينات جديدة.

٢- تحديد التتابع النيوكليوتيدى لكل الچينوم (Genome) لكائن ما.

٣- مقارنة الچينات فى الكائنات المختلفة

ويتم بناء أو إنشاء مكتبة الچينات لكائن ما تباع الخطوات الأساسية التالية:

١- عزل الـــDNA الكروموسومى من كائن ما مثل البكتيريا أو الفطريات أو الإنسان أو أى نوع نباتى أو حيوانى.

٢- تجزئة هذا الـــDNA المعزول إلى قطع صغيرة من الـــDNA بواسطة إنزيم من إنزيمات القطع المحدد (R.E.) .

٣- معاملة الحامل (Vector) المناسب لقطع الـــDNA الصغيرة السابقة بنفس إنزيم القطع المحدد (R.E.) .

٤- خلط قطع الـــDNA الكروموسومية السابقة بالحامل المناسب لتكوين قطع الـــDNA المعاد توليفها وذلك بوصلها أو ربطها بالحامل المناسب.

٥- إحداث التحول الوراثى البكتيرى للبكتيريا *E. coli* بقطع الـــDNA المعاد توليفها السابقة.

٦- عزل عدد كبير من البكتيريا *E. coli* المعدله چينياً بقطع الـــDNA المعاد توليفها.

مكتبات التعبير الجينى للكائنات حقيقية النواة

Eukaryotic Expression Libraries

فى مكتبات التعبير الجينى لجينات الكائنات حقيقية النواة يجب أن يحتوى الحامل الذى يحمل الجين المرغوب أو الجين المنقول (T.G.) على بروموتور (Promoter) ويجب أن يكون مصدره كائنات غير حقيقية النواة (بروموتور بكتيرى) وكذلك التتابع النيوكليوتيدى اللازم لإنهاء كل من نسخ الجين وإنهاء الترجمة. وعلى ذلك فإن الجين المكون (Cloned gene) سوف يتم نسخه إلى الـــmRNA والذى يتم ترجمته إلى البروتين المناسب . ومكتبات التعبير الجينى هى فى جوهرها تخليق بروتين معين لكل جين من الجينات المكلونه.

ويتم إنشاء مكتبات التعبير الجينى لجينات الكائنات حقيقية النواة باستخدام الجينات المخلقة صناعياً والعروفة باسم (c-DNA genes) وذلك لضمان أن الجين المكلون بالبكتيريا العائله يمثل الجين الحقيقى والخالى من الأنترونات، بينما فى مكتبات التعبير الجينى للكائنات غير حقيقية النواة يستخدم الـــDNA الجينومى مباشرة أو الجينات مباشرة لعدم إحتوائها على الانترونات ويتم بناء وإنشاء مكتبات التعبير الجينى لجينات الكائنات حقيقية النواة باستخدام الجينات المخلقة صناعياً والمعروف باسم c-DNA genes على النحو التالى:

١- عزل جزيئات الـــmRNA الناتجة من نسخ الجين المرغوب من خلايا الكائنات حقيقية النواة عن طريق ربطها بقطعة من الـــDNA تحتوى على عدد من نيوكليوتيدات الثيمين الطرفية (poly T) حيث ترتبط هذه القطعه بجزيئات الـــmRNA فقط وذلك لإحتوائها على الذيل المكون من عديد من نيوكليوتيدات الأدينين (Poly A tail) فى الطرف $3'$.

٢- تستخدم جزيئات الـــmRNA التى تم عزلها فى تكوين جزيء هجينـــى مـــزدوج الخـــيط (mRNA/DNA hyprid) بواســـطة اســـتخدام إنـــزيم النـــسخ العكـــسى (Reverse transcriptase) والمعزول من جزيئات الرتروڤيرس (Retrovirus).

٣- تحويل هذا الجزىء الهجينى (mRNA/DNA hyprid) إلى جزىء مزدوج الخيط من الـــ DNA بواسطة كل من إنزيم الـــRNase H وإنزيم البلمرة DNA polymerase I وبذلك يتم تخليق الچين المرغوب (c-DNA)

٤- وصل هذا الچين المخلق صناعياً (c-DNA) بحامل تعبيرى مناسب يحتوى على العناصر سابقة الذكر واللازمة لظهور التعبير الچينى للچين المرغوب.

٥- كلونة الچينات (Cloned genes) المرغوبة بالبكتيريا *E. coli* حيث يظهر التعبير الچينى لها داخل خلايا البكتيريا العائله.

٦- تنمية البكتيريا المكلونه بالچين المرغوب على بيئة آجار لتكوين مستعمرات بكتيرية مكلونه ثم نقل هذه المستعمرات البكتيرية على غشاء نيلون (Nylon membrane) حيث يرتبط البروتين الناتج من التعبير الچينى للچين المكلون بغشاء النيلون، وبعد ذلك يتم تحديد نوع هذه البروتينات بواسطة عديد من الطرق وغالباً تستخدام طريقة الأجسام المضادة (Antibodies) فى التعرف على البروتين من خلال تحضين الأجسام المضادة مع البروتين الناتج .

خصائص حوامل التعبير الچينى Features of Expression Vectors

نظراً لأن البروتينات الأجنبية التى تنتجها الچينات المكلونه فى البكتيريا *E. coli* وخصوصاً تلك البروتينات التى تنتجها البكتيريا بكميات كبيره يكون لها تأثير سام على البكتيريا *E. coli* نفسها مما يسبب موت الخلايا البكتيرية العائله لذلك يجب تنظيم التعبير الچينى للچينات المكلونه بالبكتيريا عن طريق استخدام حوامل تعبير (Expression vector) تحتوى على:

١- بروموتور (Promoter) ينظم عمل الچينات المكلونه بحيث تعمل هذه الچينات أو تتوقف عن العمل تحت ظروف معينه بطريقة تسمح للخلية البكتيرية العائله بالنمو وإنتاج البروتين الأجنبى بصورة لا تسبب موت الخلية البكتيرية العائلة. كذلك يجب أن يحتوى البروموتور على العناصر التالية:

أ- موقع ارتباط إنزيم البلمرة RNA polymerase البكتيرى حتى يتمكن هذا الإنزيم من نسخ الچين المكلون أو الچين المنقول (R.G.)

ب-موقع الاوبريتور (Operator site) حيث يرتبط به البروتين الكابت (R.P.) الذى ينتجه الچين الكابت.

ج- موقع بداية نسخ الچين المكلون (Transcription start site)

٢-أن تحتوى على الچين الكابت (Repressor gene) والذى ينظم عمل الچين المكلون مثل الچين المنظم لاوبرون اللاكتوز فى البكتيريا *E. coli* وهو الچين (Lac I gene) والذى ينتج مستوى عالى من البروتين الكابت. وباستخدام مثل هذا الچين الكابت (Lac I gene) يجعل الچين المكلون متوقف عن العمل (Switched off) ما لم يضاف المحفز بعد ذلك إلى البيئة الغذائية والذى يحفز نسخ الچين المكلون (Switched on).

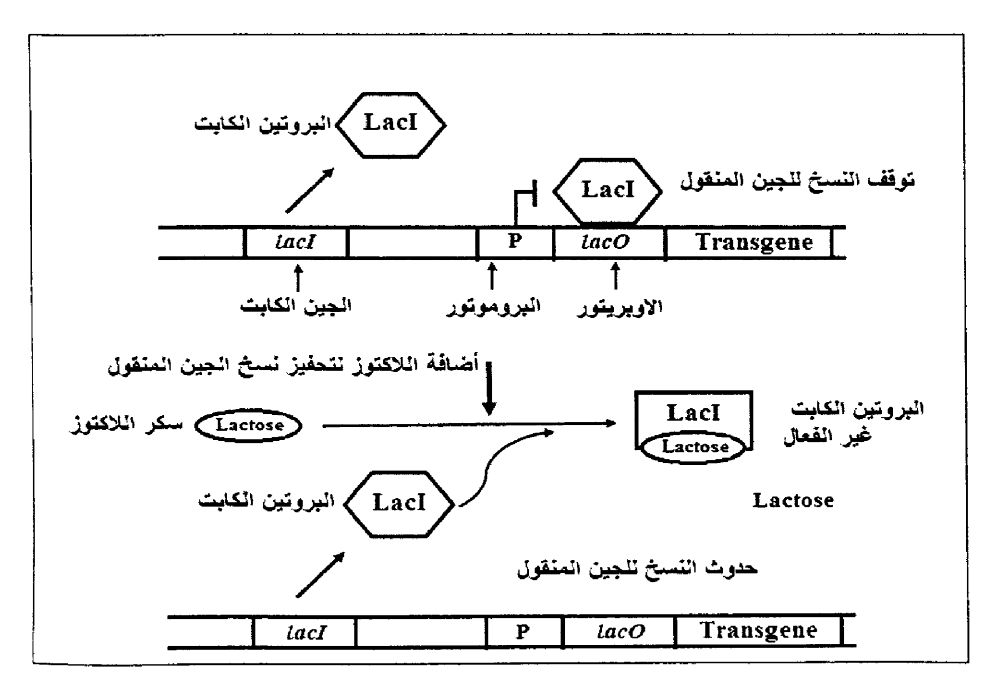
٣- أن تحتوى على منطقة منشأ التضاعف وذلك لتضاعف حامل التعبير داخل الخلية البكتيرية العائله.

٤- أن تحتوى على أحد چينات المقاومة لأحد المضادات الحيوية البكتيرية كچين مخبر(R.G.) Reporter gene عن الچين المكلون أو الچين المنقول (T.G.) وذلك للمساعدة فى انتخاب البكتيريا المكلونه التى تحمل الچين المنقول (T.G.).

ومن أمثلة هذا الطراز من البروموتور والمستخدم على نطاق واسع فى تنظيم التعبير الچينى للچينات المكلونه هو بروموتور اوبرون اللاكتوز حيث يتيح هذا البروموتور أعلى مستوى من نسخ الچين المكلون تحت الظروف التحفيزية باستخدام المحفزات والتى تمثل مركبات كيميائية تضاف إلى البيئة الغذائية للبكتيريا المكلونه ويتم تنظيم التعبير الچينى للچينات المكلونه باستخدام هذا النظام على النحو التالى (شكل ٦٢):

أ- فى غياب المحفز يرتبط البروتين الكابت (R.P.) الذى ينتجه الچين الكابت (Lac I gene) بموقع الاوبريتور (Operator) وبالتالى لا يستطيع إنزيم البلمرة (RNA polymerase) نسخ الچين المكلون ويصبح فى صورة متوقف عن العمل (Switched off).

ب- فى وجود المحفز وهو فى هذه الحالة عباره عن سكر اللاكتوز أو شبيهه (IPTG) إلى البيئه الغذائية يتحرر البروتين الكابت من على موقع الاوبريتور وبالتالى يستطيع إنزيم البلمرة من الاستمرار فى نسخ الچين المكلون ويصبح البروتين الكابت غير قادر على الارتباط بموقع الاوبريتور ويصبح الچين المنقول (T.G.) فى صورته الفعالة وظيفياً (Switched on) .



شكل (٦٢): تنظيم التعبير الچينى للچين المنقول Transgene

الباب الثامن

النباتات المعدلة جينياً

Transgenic Plants

نظرة تاريخية لتربية النبات Historical View of Plant Breeding

قام الإنسان منذ آلاف السنين بتحسين النباتات والحيوانات المستأنسة عن طريق التربية بالانتخاب (Selection breeding) وذلك بالانتخاب للأفضل بالنسبة للإنسان والتى غالباً ما كانت تخضع هذه الطريقة لكل من النجاح والفشل. ومنذ بداية القرن العشرين عرف مربى النبات والحيوان أن هذا التحسين له أساس وراثى ومازال عديد من العلماء يستخدمون طرق التربية التقليدية (.Traditional Plant Breeding (T.P.B المعروفه فى الأغراض التاليه:

١- زيادة المحصول النباتى.

٢- زيادة المقاومة الوراثية للعديد من الآفات الحشرية والأمراض النباتية.

٣- زيادة تحمل (Tolerance) محصول نباتى معين للظروف البيئية القاسية (Environmental stress) مثل درجات الحرارة المرتفعة أو المنخفضة أو تحمل الإجهاد المائى (Drought tolerance) وكذلك تحمل زيادة الأملاح فى التربة (Salinity tolerance).

وعلى الرغم من أن التهجين البسيط بين النباتات عالية المحصول ينتج نسلاً يعطى محصولاً أعلى من الآباء إلا أن هذه الطريقة تحتاج إلى وقت طويل. وعلى الرغم أيضاً من أن بعض الأنواع النباتية يحدث فيها التلقيح الخلطى والذى قد يؤدى إلى اكتشاف أحد النباتات فى النسل قد يعطى محصولاً مرتفعاً إلا أن اكتشاف هذه النباتات عالية المحصول يكون محدوداً بكمية التنوع الوراثى (Genetic diversity) الموجودة فى الآباء. فإذا أُجرى التهجين بين آباء تحمل نفس

الچينات بمعنى عدم وجود اختلافات وراثية فإن كمية التحسين الوراثى تكون محدوده والأكثر من ذلك إذا كان الغرض هو الحصول على نباتات مقاومة وراثياً للآفات الحشرية أو الأمراض النباتية وكانت الآباء المستخدمة فى التهجين لا تحتوى على هذه الچينات التى تسبب صفة المقاومة فإنه لا توجد أى طريقة من طرق التربية التقليدية ((T.P.B.)) يمكن استخدامها لتحسين صفة المقاومة الوراثية للآفات الحشرية والأمراض النباتية مما يتطلب البحث عن إيجاد الطرق البديلة لتحقيق هذا الغرض.

وفى الثلاثينات من القرن العشرين استخدم العلماء المطفرات الكيميائية (Chemical mutagenesis) بتعريض بذور النباتات لاستحداث الطفرات فى البذور وكذلك استخدام الأشعة السينية (X-rays) وأشعة جاما (Gamma rays). وعلى الرغم من فعالية هذه الطريقة إلا أنه يصعب التنبأ بوجود الصفات المرغوبة والحصول عليها بواسطة طرق التربية التقليدية (T.P.B.). ومع ذلك فإن هذه الطريقة من طرق التربية بالطفرات (Mutation breeding) كانت ناجحة فى نباتات الزينة ونباتات الخضر والفاكهة والمحاصيل الحقلية وأن بعض الأصناف النباتية التى نتناولها كغذاء سواء كانت خضر أو فاكهة تم تحسينها بهذه الطريقة. وتتلخص طريقة التربية بالطفرات فى الخطوات التاليه:

١- تعريض عدد كبير من البذور النباتية إلى المطفرات الكيميائية لتوليد الطفرات فى الـDNA.

٢- زراعة البذور الناتجة من المعاملة بالمطفرات فى الحقل لاكتشاف النباتات أو الثمار أو الأزهار المحسنة على الرغم من أن هذه المعاملة بالمطفرات قد تسبب موت الأجنة فى عدد كبير من البذور المعامله.

٣- إذا اكتشف النبات الذى يحتوى على الصفة المحسنة يجرى اختبار نسل هذا النبات من حيث تواجد الصفة المحسنة فى هذا النسل من عدمه.

٤- إذا ثبت وجود الصفة المحسنة فى النسل فإن ذلك يؤكد أنها تورث (Heritable) إلى النسل من جيل لآخر.

٥- يجرى إكثار هذا النبات المحسن عن طريق الطفرة والذى قد يحتاج إلى فترة طويلة قبل أن يباع هذا الصنف النباتى المحسن فى الأسواق على نطاق تجارى.

٦- التأكد من أن هذا الصنف المحسن الجديد والذى يباع فى الأسواق على نطاق تجارى لم يتعرض أبداً للمطفرات وحتى وقتنا الحالى تستخدم طريقة التربية بالطفرات مع تطويرها باستخدام وسائل البيولوجيا الجزيئية لتحديد وتعيين الچين الحقيقى المرتبط بالشكل المظهرى (Phenotype) المرغوب.

وحديثاً فتحت تكنولوچيا الـــDNA المعاد توليفه (.Recombinant DNA Technology (R.D.T الباب لإستخدام طرق معرفة وتحديد الچين المرغوب مباشرة واستخدامه فى تحسين النباتات بطريقة مباشرة من خلال نقل الچين (Gene transfer) المرغوب من أى مصدر وإدخاله فى النباتات بواسطة تكنولوچيا الـــDNA المعاد توليفه (.R.D.T) والحصول على نباتات معدلة چينياً (.Transgenic Plants (T.G.P . وفى وقتنا الحالى تتركز اهتمامات تكنولوچيا الـــDNA المعاد توليفه فى الأهداف التاليه:

١- إنتاج نباتات معدلة چينياً مقاومة وراثياً للآفات الحشرية.

٢- إنتاج أصناف نباتية معدلة چينياً مقاومة وراثياً لبعض مبيدات الحشائش (Herbicide).

٣- إنتاج أصناف نباتية معدلة چينياً تتحمل الظروف البيئية القاسية مثل تحمل الإجهاد المائى أو تحمل زيادة نسبة الأملاح فى التربة وكذلك بعض الظروف البيئية القاسية الأخرى مثل ارتفاع درجة الحرارة أو تحمل البروده.

٤- زيادة محتوى المحصول النباتى من بعض الأحماض الأمينية الأساسية الهامة وكذلك بعض الفيتامينات.

وتتلخص الفروق الجوهرية بين طرق التربية التقليدية (.T.P.B) وتكنولوچيا الـ DNA المعاد توليفه (.R.D.T) فى النقاط التاليه:

١- مصدر الچين المنقول (T.G.) فى تكنولوچيا الـDNA المعاد توليفه إلى النباتات المعدلة چينياً قد يكون من نوع أو جنس نباتى آخر أو حتى من عائله نباتية أخرى أو قد يكون مصدره من خلية حيوانية أو خلية بكتيرية أو ڤيرس (Virus). بينما فى طرق التربية التقليدية ينحصر نقل الچين فى التهجين بين أصناف نفس النوع النباتى (Intraspecific hybridization) أو التهجين بين الأنواع النباتية المختلفة فى نفس الجنس (Interspecific hybridization) إذا وجد الچين المرغوب نقله.

٢- يكون الچين المنقول (T.G.) فى تكنولوچيا الـDNA المعاد توليفه (R.D.T.) معروف وظيفته وتم كلونته (Cloning) وإكثاره بصورة مكثفة قبل إدخاله فى النباتات المعدلة چينياً . بينما فى طرق التربية التقليدية نادراً ما يكون معروفاً تحديد الچين المرغوب أو الچين المنقول.

٣- فى طريقة تكنولوچيا الـDNA المعاد توليفه يتم نقل الچين إلى النباتات المعدلة چينياً بواسطة چين منقول أو چين أجنبى بطريقة مباشرة بينما فى طرق التربية التقليدية يتم نقل هذا الچين المرغوب من أحد الأصناف النباتية إذا وجد هذا الچين بطريقة غير مباشرة.

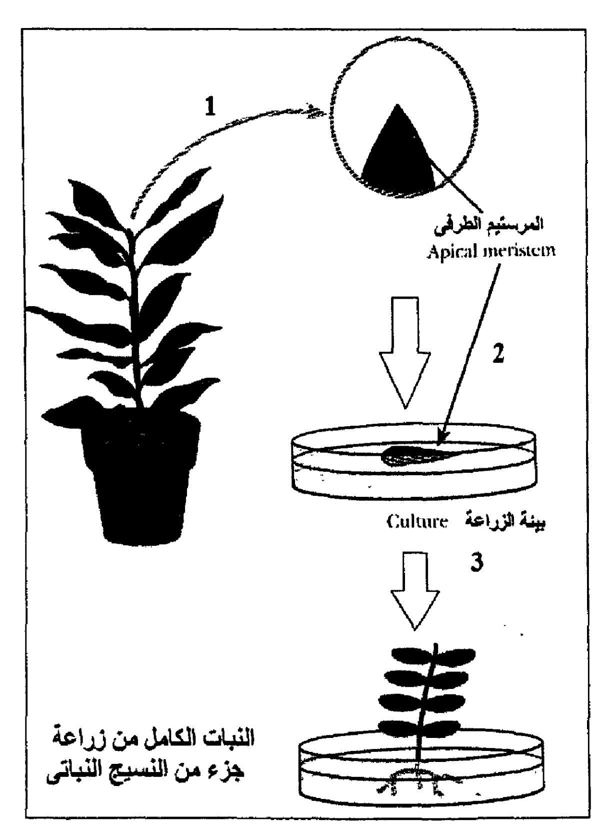
الوسائل المستخدمة فى تكنولوچيا الـ DNA المعاد توليفه

Tools for Recombinant DNA Technology

أولاً: زراعة الأنسجة النباتية Plant Tissue Culture

من أحد المميزات الرئيسية للنباتات أنها تمتلك القدرة الكامنة (Totipotency) والتى تتمثل فى إمكانية الحصول على نبات كامل النمو من إعادة نمو خلية نباتية مفرده أو جزء من النسيج النباتى (شكل ٦٥) بينما لا تمتلك الخلايا الحيوانية هذه القدرة الكامنة. هذه الخاصية الفريده للنباتات تسمح للعلماء بتنمية الخلايا النباتية فى مزارع خلوية (Cell culture) أو مزارع أنسجة (Tissue culture) والتى يحدث لها إعادة نمو لتكوين نبات كامل النمو فى هذه المزارع الخلوية أو فى مزارع الأنسجة النباتية. وتجرى زراعة الأنسجة النباتية إما على بيئة صلبة

وتسمى بطريقة الكالس (Callus culture) أو على بيئة سائله وتسمى بطريقة المعلق (Suspension culture). وفى كلا الطريقتين يؤخذ قطعة من النسيج النباتى أو الخلايا والتى تعرف باسم (Explants) من النبات المرغوب إكثاره بطريقة زراعة الخلايا أو الأنسجة.



شكل (٦٣): يوضح إعادة تكوين (Regenerated) نبات كامل من جزء من نسيج نباتى فى الخطوات التاليه:

١- أخذ البرعم الطرفى (Apical meristem) من النبات الكامل الأصلى.

٢-تنمية هذا البرعم الطرفى على بيئة غذائية مناسبة تحتوى على الهرمونات اللازمة لإعادة نمو هذه الخلايا الموجودة فى البرعم الطرفى مرة ثانية.

٣-تكوين نبات جديد كامل النمو.

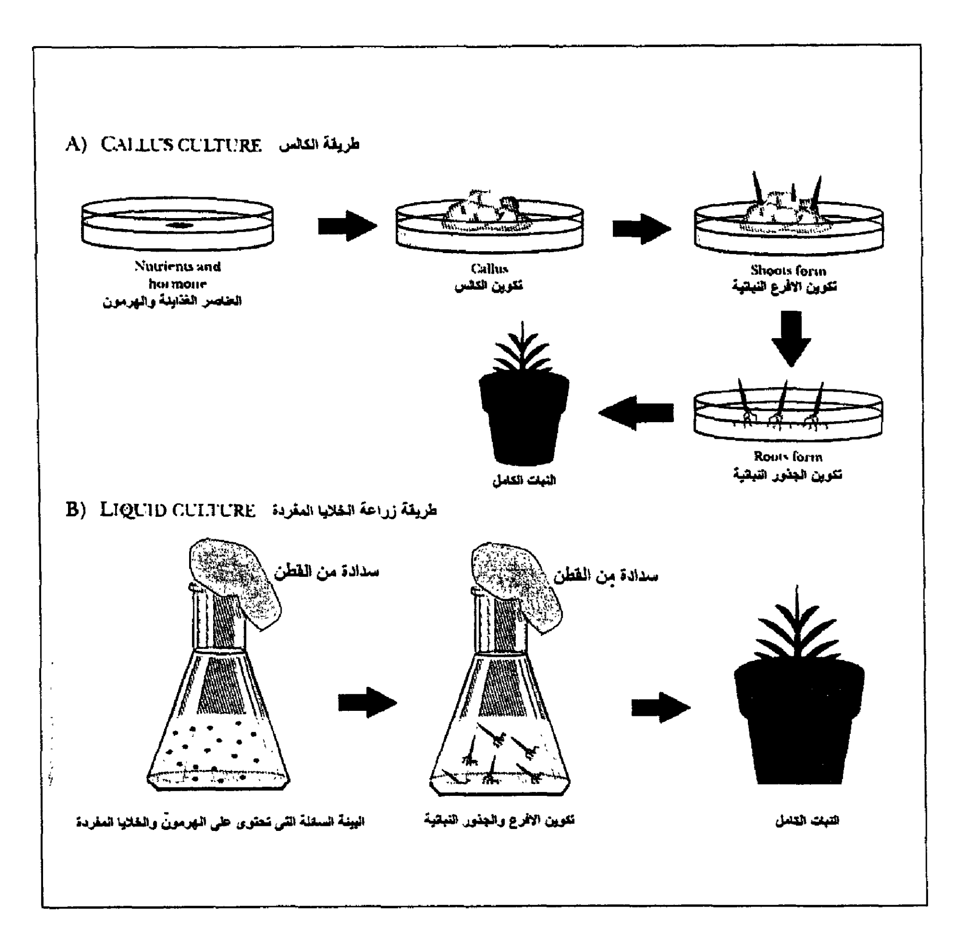
١- طريقة زراعة الكالس (Callus culture)

وفى هذه الطريقة يؤخذ جزء من النسيج النباتى (Explants) من المرستيم الطرفى من النبات وهى المنطقة من النبات التى ينمو منها الأفرع النباتية الجديدة أو يؤخذ جزء من قمة

الجذر ويوضـــع علـــى بيئـــة صـــلبة حيـــث تنـــتج الخلايـــا الناميـــة وغيـــر المتـــشكلة (Undifferentiated) طبقة بيضاء على قمة البيئة الصلبة والتى تسمى بالكالس (Callus). وبعد حوالى شهر من النمو تنقل كتلة الخلايا المتكونة وغير المتشكلة إلى بيئة غذائية أخرى تحتوى على تركيز منخفض من هرمون النمو أو إلى بيئة تحتوى على هرمونات مختلفـــة. ويسمح نقص كمية هرمون النمو لبعض الخلايا غير المتشكلة فى خلايا الكالس بتكوين فرع نباتى (Plant shoot). وفى معظم الحالات تشبه الأفرع النباتية الصغيرة والناتجة من الكالس أوراق النبات الجديدة النامية. وبعد ٣٠ يوم أخرى يزال هرمون النمو تماماً مما يـــسمح ببداية تكوين الشعيرات الجذرية من بعض الأفرع النباتية النامية وبذلك نحصل على نباتـــات صغيرة يمكن نقلها للتربة للحصول على نبات كامل (شكل ٦٤).

٢- **طريقة المعلق (Suspension culture)**

فى هذه الطريقة يجب فصل الخلايا عن بعضها الموجودة فى الجزء المأخوذ من النبات (Explant). وغالباً ما تستخدم الخلايا النباتية التى أزيلت جدرها الجلويـــة (البروتوبلاســـت Protoplast) أو خلايا حبوب اللقاح غير الناضجة (Microspores) أو خلايا البويضات غيـــر الناضجة (Macrospores) حيث تنمى هذه الخلايا على بيئة سائلة تحتوى على مخلـــوط مـــن المواد الغذائية وبعض الهرمونات النباتية الخاصة والتى تحفز الخلايا النباتية غير المتشكلة على النمو (شكل ٦٤) ويلاحظ أنه يحدث نمو لكل من الأنسجة التى تعطى الفرع والجذر النباتى فى نفس الوقت. وتستجيب الأنواع النباتية المختلفة لهرمونات النمو المختلفة بـــدرجات متفاوتـــة ، فعلى سبيل المثال تنمو الخلايا والأنسجة النباتية للقمح علـــى بيئـــة تحتـــوى علـــى هرمـــون 2,4, dichlorophenoxyacetic acid (2,4,D) وهو مناظر لهرمون النمو النبـــاتى الأوكـــسين (Auxin) والذى يقوم بتنبيه الخلايا النباتية للنمو والتشكل بينما فى زراعة خلايا وأنسجة نبات الطماطم يستخدم هرمون السيتوكينين (Cytokinine) والذى يدفع الخلايا إلى الانقسام الخلـــوى مرة أخرى.



شكل (٦٤): يوضح أن الخلايا النباتية يمكنها أن تستعيد نموها مرة ثانية (Regenerated) لتنتج نبات كامل

A– فى زراعة الكالس (Callus culture) تنمو مجموعة من الخلايا غير المتشكلة على سطح البيئة الصلبة (Solid medium) .

B– فى البيئة السائلة (Liquid culture) تنمو الخلايا المفرده على هذه البيئة السائلة.

وفى كلا الطريقتين يحدث تكوين للأفرع (Shoots) والجذور (Roots) باستخدام التركيزات المناسبة من الهرمونات النباتية للحصول على نباتات كاملة النمو.

ونظراً لإمكانية إكثار النباتات عن طريق زراعة الخلايا أو الأنسجة النباتية فإنه يمكن إنتاج عديد من مئات بل آلاف من النباتات من مصدر واحد وبالتالى يمكن الحصول على سلاله نباتية تسمى بالكلون (Clone) من نبات واحد. وتستخدم هذه الطريقة لإكثار النباتات النادرة والتى تحتاج فقط إلى استخدام جزء صغير من النبات (Explant) لتوليد عديد من مئات النسل المتطابق وراثياً. لذلك يمكن استخدام هذه الطريقة فى إكثار النباتات التى يصعب إكثارها عن طريق البذور. كذلك تستخدم فى طريقة التربية بالطفرات بدلاً من استخدام البذور وتعريضها للمطفرات بتعريض خلايا الكالس غير المتشكلة إلى المطفرات ثم تنمية هذه الخلايا بعد ذلك للحصول على نباتات كاملة النمو وبذلك تكون المطفرات أكثر فعالية من تعريض البذور للمطفرات. وعلى الرغم من استخدام طريقة زراعة الخلايا والأنسجة بصورة شائعة إلا أنه وجد أن النباتات الناتجة بهذه الطريقة تحتوى على ثلاثة طرز من التحورات أو التغيرات وهى:-

١-**تغيرات فسيولوجية مؤقتة** حيث وجد أن نباتات التوت البرى (Blueberry) الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية كانت أقصر فى الطول كثيراً عن النباتات الناتجة من زراعة البذور ولكن هذه التغيرات ليست دائمه لأنه بعد عدد قليل من السنين من تنميتها فى الحقل تصبح هذه النباتات مشابهة تماماً للنباتات الطبيعية .

٢-**تغيرات إيبچينية (Epigenic changes)** وتتواجد هذه التغيرات أثناء دورة حياة النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة ولكنها لا تنتقل إلى الجيل الثانى بمعنى أنها لا تورث وغالباً ما ترجع هذه التغيرات إلى حدوث إضافة مجاميع الميثايل إلى الـــDNA.

٣-**تغيرات وراثية (Genetic changes)** وهى تغيرات وراثية حقيقية تؤثر على النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة وعلى النسل الناتج منها وهذه التغيرات قد ترجع إلى التغير فى مستوىالتضاعف الكروموسومى بمعنى حدوث تضاعف الكروموسومات ثلاثة مرات (Triploidy) أو أربعة مرات (Tetraploidy) أو قد ترجع إلى حدوث الطفرات البسيطة أو إلى تنشيط قطع الـــDNA المتنقلة داخل الچينوم أو إلى حدوث تغيرات وراثية فى چينوم (DNA) البلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا ولكن باستخدام التغيرات فى مكونات البيئة الغذائية أثناء تنمية زراعة الخلايا والأنسجة يؤدى إلى انخفاض كبير فى معدل الطفور.

ثانياً: إدخال الجينات فى النباتات باستعمال البلازميد Ti-plasmid

Insertion Gene into Plants Using Ti-plasmid

تعانى بعض الأنواع النباتية من الأورام (Tumers) والتى تختلف تماماً عن الأورام السرطانية (Cancers) فى الحيوانات. وترجع غالبية هذه الأورام إلى البلازميد البكتيرى والمعروف باسم (Ti-plasmid) أو البلازميد المحدث للورم والذى يتواجد فى بكتيريا التربة *Agrobacterium tumefaciens*. ويعتبر هذا البلازميد أحد الوسائل الهامة فى إنتاج نباتات معدلة جينياً (T.G.P.) وخاصة النباتات ذات الفلقتين وذلك بسبب حدوث إنتقال طبيعى لقطعة خاصة من هذا البلازميد تعرف باسم (T-DNA) والتى تنتقل من البكتيريا التى تحمل هذا البلازميد إلى الخلايا النباتية بطريقة طبيعية. ولقد أستغل علماء الوراثة الجزيئية هذه الخاصية فى هذا البلازميد (Ti-plasmid) واستخدامه كوسيلة لنقل قطع من الــDNA (الجينات) إلى نباتات المملكة النباتية فى الوقت الذى يكون فيه هذا الانتقال الوراثى عن طريق التهجين (Hybridization) بين النباتات محدداً بالأنواع قريبة الصلة تماماً من بعضها.

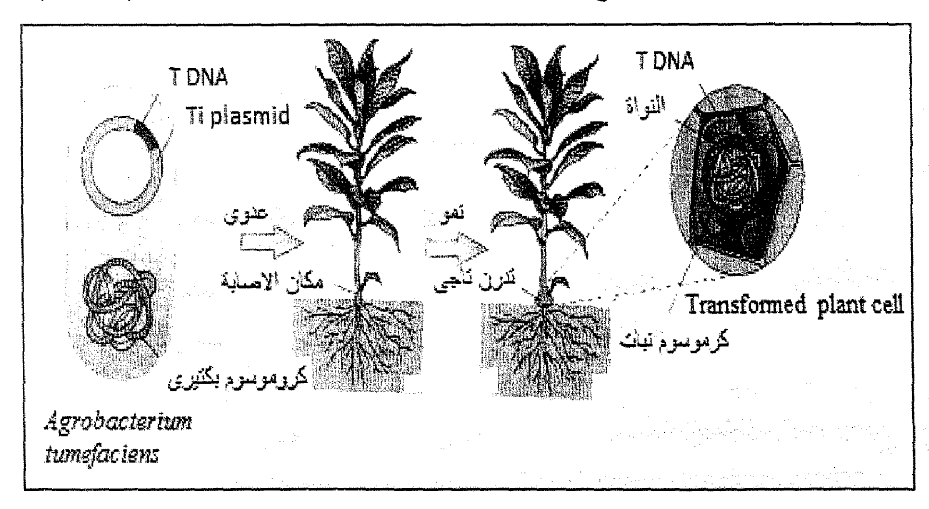
أ- الطبيعة البيولوجية للبكتيريا أجروباكتيريم

تنجذب البكتيريا أجروباكتيريم فى الطبيعة إلى النباتات التى بها جروح بسيطة والتى غالباً ما تكون فى منطقة اتصال ساق النبات بالتربة حيث تفرز النباتات المجروحة مركبات فينولية مثل الاسيتوسيرينجون (Acetosyringone) عند مناطق الجروح والتى تجذب البكتيريا إليها حيث تحفز هذه المركبات الفينولية حركة البكتيريا واتصالها بالمناطق المجروحة من النباتات كما تحفز وتنشط التعبير الجينى لجينات العدوى virulence genes (*vir* genes) والموجودة على البلازميد Ti-plasmid.

ب- الطبيعة الكيميائية للــTi-plasmid Chemical Nature of Ti-plasmid

هذا البلازميد من البلازميدات البكتيرية الكبيرة الدائرية (Circular DNA) والذى يحتوى ما بين ١٥٠٠٠٠ إلى ٢٥٠٠٠٠ زوج من النيوكليوتيدات وتحتوى قطعة الــT-DNA

على ٢٣٠٠٠ زوج من النيوكليوتيدات وتمثل الچينات التى تنتج بعض الهرمونات النباتية مثل السيتوكينين (Cytokinine) والأوكسين (Auxin) والتى بزيادة تركيزها فى الخلية النباتية يدفعها إلى الإنقسام الخلوى المتتالى مكونة الورم المعروف باسم التدرن التاجى (Crown gall) فى منطقة اتصال ساق النبات بالتربة (شكل ٦٥). كما تحتوى قطعة الــT-DNA على الچينات التى تنتج بعض الأحماض العضوية الشاذه وهى الاوبينات (Opines) مثل الاوكتابين (Octapine) والنوبالين (Nopaline) والتى تستخدمها البكتيريا كمصدر للطاقة كما يحتوى البلازميد Ti-plasmid الچينات اللازمة والضرورية لحدوث العدوى (*vir* genes) والتى يبلغ عددها ٢٥ چين (25 *vir* genes) بطول ٣٥٠٠٠ زوج من النيوكليوتيدات ويحد قطعة الــT-DNA عند طرفيها قطعة من الــDNA تحتوى على ٢٤ زوج من النيوكليوتيدات تعرف بالحواف (Borders) تمثل المواقع التى يحدث عندها إستئصال قطعة الــT-DNA (شكل ٦٦)



شكل (٦٥): يوضح تكوين ورم التدرن التاجى (Crown gall) :

١ – يحدث اتصال بكتيريا *Agrobacterium* بالخلايا النباتية فى مناطق الجروح والتى غالباً ما تكون فى منطقة اتصال ساق النبات بالتربة.

٢ – انتقال نسخة من القطعة T-DNA إلى الخلية النباتية واندماجها فى أحد كروموسومات الخلية النباتية العائلة .

٣ – الچينات الموجودة على القطعة T-DNA توجه تكوين الورم (Crown gall) .

وتنتقل قطعة الـــT-DNA خلال مجموعة من الخطوات المعقدة يمكن تلخيصها فيما يلى (شكل ٦٧) :

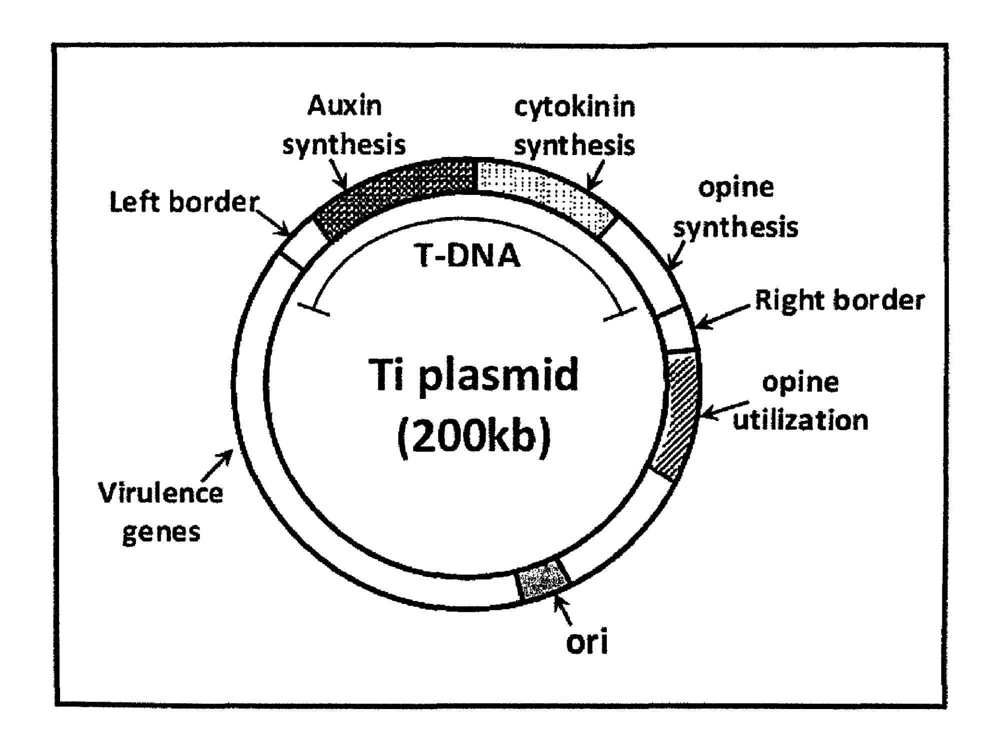
١- تنجذب البكتيريا أجروباكتيريم إلى مناطق الجروح فى النباتات بواسطة بعض المركبات الفينولية والتى تحفز أيضا بعض جينات العدوى (Vir genes) .

٢- عند سطح الخليه البكتيرية يحدث فسفرة ذاتية للبروتين Vir A و الذى يقوم بنقل الفوسفات إلى البروتين Vir G و الذى يرتبط بالـــDNA لتحفيز نسخ جينات العدوى .

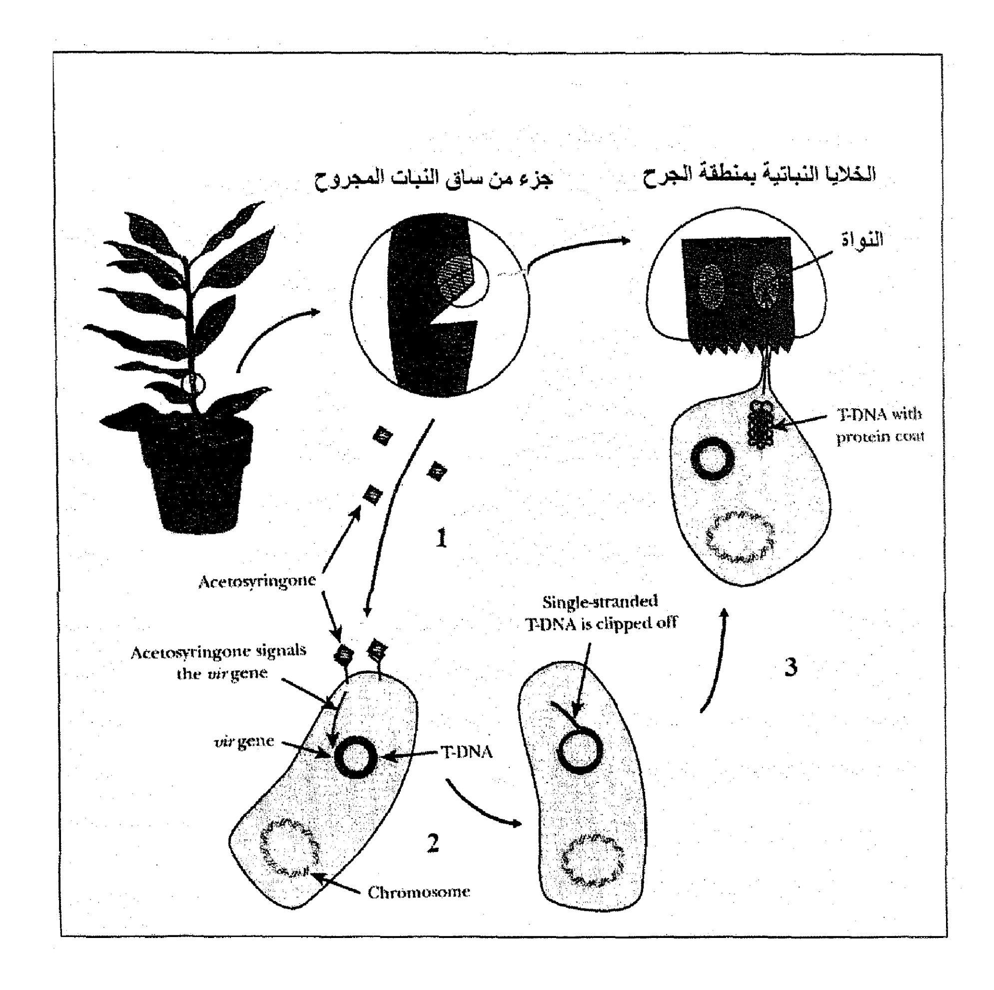
٣- تقوم البروتينات Vir D1 و Vir D2 بقطع خيط مفرد من قطعة الـــT-DNA عند حوافها ثم يرتبط البروتين Vir D2 بالطرف $5^{/}$ من قطعة الـــT-DNA . تقوم انزيمات الـــ Helicases البكتيرية بفك حلزنة قطعة الـــT-DNA من البلازميد Ti و بالتالى تحرر قطعة الـــT-DNA المفردة الخيط من البلازميد ثم يعاد إصلاح تلك الفجوة على البلازميد Ti .

٤- تغطى قطعة الـــT-DNA بالبروتين Vir E2 و تلك هى الصورة التى ينتقل بها إلى الخلية النباتية عبر قناة اتصال (Pilus) بين الخلية البكتيرية والخلية النباتية تتركب من بروتينات تنتجها بعض جينات العدوى .

وبمجرد أن تصبح قطعة الـــT-DNA جزء من چينوم (DNA) الخليـــة النباتيـــة يحـــدث التعبير الچينى للچينات التى تنتج الهرمونات النباتية السيتوكينين والاوكسين حيث يسبب هرمون الاوكسين زيادة فى نمو الخلية بينما يقوم هرمون السيتوكينين بدفعها للإنقسام الخلوى المتتـــالى والسريع مكوناً الورم المعروف بالتدرن التاجى (Crown gall) . ويرجع الـــسبب فـــى حـــدوث التعبير الچينى للچينات الموجودة على قطعة الـــ T-DNA داخل الخلية النباتية إلى احتوائها على بروموتور شبيه ببروموتور الكائنات حقيقية النواة وبذلك لا توجد عقبة أمـــام التعبيـــر الچينـــى للچينات الموجودة بقطعة الـــT-DNA داخل الخلية النباتية.



شكل (٦٦) :يوضح مكونات البلازميد Ti-plasmid والقطعة T-DNA التى تنتهى بـالحواف(Borders) شمال ويمين قطعة الـ T-DNA والتى تحتوى على جينات تخليق الاوكسين (Auxin) والسيتوكينين (Cytokinin) والاوبين (Opine) وهذه الجينات يحدث لها نسخ وترجمة فقط فى الخلية النباتية العائلة وخارج القطعة T-DNA توجد مجموعة جينات العدوى (*Vir* genes) المتجمعة وكذلك الجين أو الجينات اللازمة لميتابوليزم الاوبين وكذلك منطقة منشأ التضاعف origin of DNA replication (Ori) والتى تسمح بتضاعف البلازميد بصورة ثابتة داخل البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* .



شكل (٦٧): يوضح خطوات وآلية انتقال قطعة ال T-DNA من البلازميد Ti-plasmid إلى نواة الخليه النباتيه

جـ-استخدام البلازميد Ti-plasmid فى إدخال الچين المنقول

Insertion the Transgene into plants using Ti-plasmid

لكى يستخدم هذا البلازميد كوسيلة لنقل الچين المنقول (T.G.) إلى النباتات فإنه يجب إزالة الچينات التى تنتج الهرمونات النباتية من قطعة الـT-DNA ولذلك لا يستخدم هذا البلازميد مباشرة كوسيلة لنقل وإدخال الچين المنقول إلى النباتات ولكن يجرى عملياً إعادة تكوين بلازميد معاد توليفه من هذا البلازميد (Recombinant Ti-plasmid) والذى يجب أن يحتوى على العناصر التاليه بالاضافة لچينات حدوث العدوى *Vir* genes :

١- الچين المنقول (T.G.) والبروموتور الخاص به وهذا البروموتور إما أن يعمل بصورة تحفيزية حيث يجعل هذا البروموتور الچين المنقول إما أن يعمل أو لا يعمل طبقاً لحاجة التعبير الچينى للچين المنقول أو أن يعمل هذا البروموتور بصورة مستمرة حيث يجعل هذا البروموتور الچين المنقول قادراً على أن يظهر تعبيره الچينى فى أى نسيج نباتى وكذلك فى الثمار.

٢- الچين المخبر (R.G.) Reporter gene وهو الچين الذى يستخدم للكشف عن وجود الچين المنقول من خلال إنتخاب الخلايا التى حصلت على الچين المنقول من باقى الخلايا الأخرى وغالباً ما يكون هذا الچين المخبر (R.G.) هو چين المقاومة لأحد المضادات البكتيرية الحيوية كما يجب أن يحتوى هذا الچين المخبر على البروموتور الخاص به والذى يجب أن يجعل التعبير الچينى للچين المخبر (R.G.) بصورة مستمرة.

ومن الناحية العملية يجرى إحلال هذه المكونات السابقة بدلاً من الچينات الموجودة فى قطعة الـT-DNA والتى تنتج الهرمونات النباتية وبذلك نحصل على بلازميد معاد توليفه يحتوى على الچينات اللازمة لحدوث العدوى وفى نفس الوقت يحتوى على الچين المنقول (T.G.) والقادر على اظهار تعبيره الچينى فى الخلايا النباتية فضلاً عن إمكانية إنتخاب الخلايا المعدلة چينياً والتى تحتوى على الچين المنقول.

وربما يسبب استخدام الچين المخبر (R.G.) بعض المشاكل بسبب أنه يجب أن يظهر تعبيره الچينى بصورة مستمرة خلال أنسجة النبات ويخشى كثير من المستهلكين من أن البروتين الناتج من الچين المخبر قد يسبب بعض الحساسية أو تفاعلات أخرى إذا ظهر تعبيره الچينى فى الحبوب أو الثمار أو الخضراوات للنباتات المعدلة چينياً (T.G.P.) وخاصة عندما يكون الچين المخبر هو چين المقاومة للمضادات البكتيرية الحيوية. ومع ذلك فإنه توجد حالياً من الأنظمة البيولوجية والمتاحة حالياً والتى يمكن إستخدامها فى إستئصال وإزالة الچين المخبر من النباتات المعدلة چينياً وسوف نتناول ذلك فيما بعد بالتفصيل.

د- إنتاج نباتات معدلة چينياً بواسطة البلازميد المعاد توليفه

Production of Transgenic plant using Recombinant Ti-plasmid

من الناحية العملية تستخدم البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* كوسيلة لإدخال الچين المنقول إلى النباتات بإتباع الخطوات التاليه (شكل ٦٨):

١- إستخدام مزارع الأنسجة النباتية سواء عن طريق إستخدام بروتوبلاست الخلايا النباتية أو بإستخدام قطع الكالس (Callus) النباتية. ومعاملة أى من البروتوبلاست أو الكالس النباتى بالكتيريا أجروباكتيريم التى تحتوى على البلازميد المعاد توليفه والذى يحتوى على الچين المنقول والعناصر الأخرى سابقة الذكر.

٢- تحضين الخلايا النباتية على بيئة النمو فى وجود أحد المضادات البكتيرية الحيوية إذا كان الچين المخبر هو چين المقاومة لأحد المضادات الحيوية أو أحد مبيدات الحشائش (Herbicide) إذا كان الچين المخبر (R.G.) هو چين المقاومة لمبيد الحشائش المستخدم. هذه المعاملة تؤدى إلى موت جميع الخلايا النباتية التى لم تحصل على البلازميد المعاد توليفه وبالتالى لم يحدث لها تحول وراثى وتبقى وتنمو وتستمر فى النمو فقط الخلايا النباتية التى حصلت البلازميد المعاد توليفه وما يحمله من الچين المنقول وهى الخلايا التى حدث لها تحول وراثى.

٣- توجيه الخلايا المعدلة جينياً لإنتاج أفرع (Shoots) نباتية وجذور (Roots) نباتية بتغيير تركيز الهرمونات النباتية فى البيئة الغذائية.

٤- إنتخاب النباتات الصغيرة (Plantlet) والمعدلة جينياً وفحصها وغربلتها من حيث مستوى التعبير الجينى للجين المنقول (T.G.).

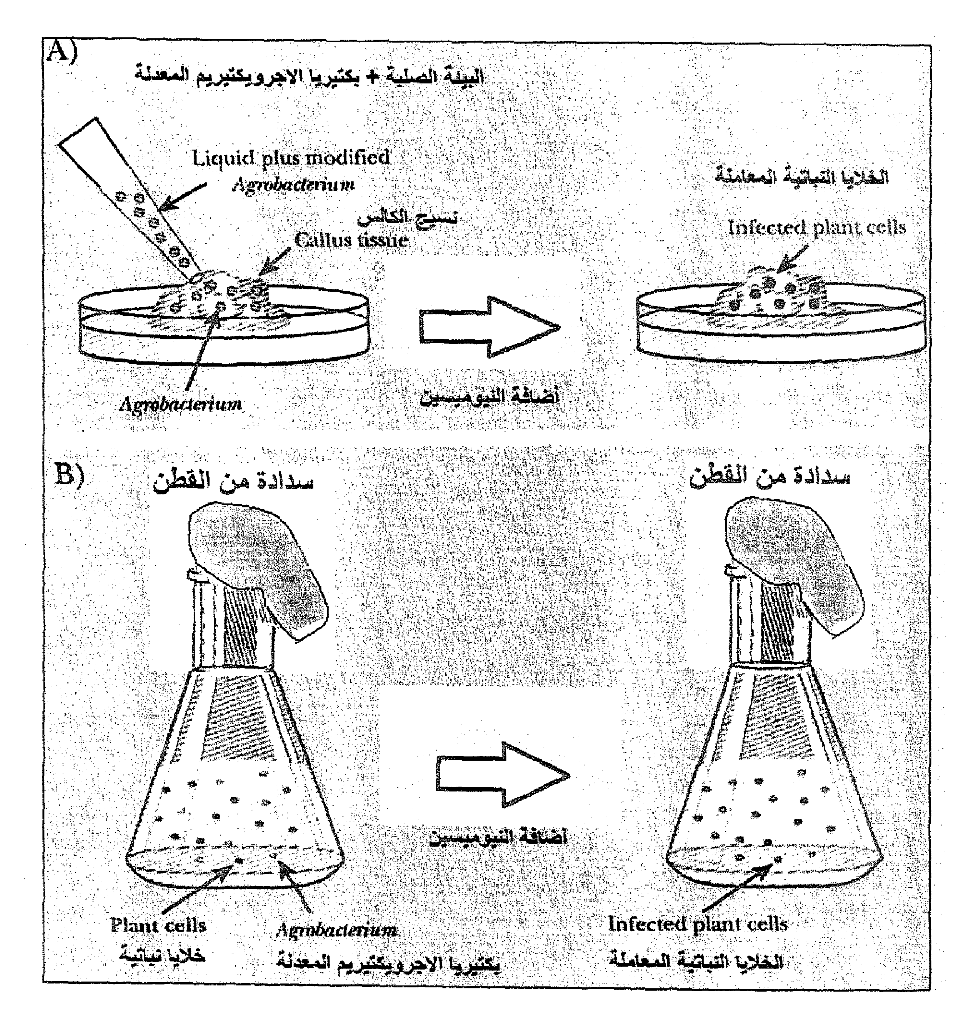
وحديثاً طورت هذه الطريقة والذى أدى إلى ثورة علمية جديدة فى مجال إنتاج النباتات المعدلة جينياً (T.G.P.) بإستخدام النبات النموذجي وهو نبات الارابيدوبسس (Arabidopsis) كما أمتدت أيضاً إلى نباتات أخرى مثل الذرة والقمح وتتلخص خطوات إستخدام نبات الارابيدوبسس فى إنتاج النباتات المعدلة جينياً فيما يلى:

١- تنمية نبات الارابيدوبسس على بيئة غذائية حتى يبدأ تكوين البراعم الزهرية.

٢- أخذ هذه البراعم الزهرية والسماح لها بإعادة نموها على بيئة غذائية لعدة أيام.

٣- بمجرد أن يبدأ أعادة نمو هذه البراعم الزهرية تغمر فى معلق يحتوى على البكتيريا أجروباكتيريم التى تحتوى على البلازميد المعاد توليفه وما يحمله من الجين المنقول والعناصر الأخرى سابقة الذكر، كذلك يحتوى هذا المعلق على Surfactant يسمح للبكتيريا بالإلتصاق بالنباتات النامية وانتقال قطعة الـT-DNA المعدلة جينياً من البلازميد المعاد توليفه لتصبح هذه القطعه من الـT-DNA المنقولة جزء من چينوم (DNA) النسيج التناسلى (Germline).

٤- يسمح للنباتات بإستكمال نموها حتى تتكون البذور ثم تحصد هذه البذور ويجرى تنميتها على بيئات غذائية إنتخابية لإكتشاف تلك النباتات المعدلة چينياً (T.G.P.) باضافة مبيد الحشائش المناسب إلى هذه البيئة الانتخابية إذا كان الچين المخبر هو چين المقاومة لهذا المبيد وعلى الرغم من أن هذه الطريقة تعطى نسبة منخفضة من النباتات المعدلة چينياً إلا أنه يمكن عزل عديد من البذور التى نجحت فى تحقيق الهدف.



شكل (٦٨): يوضح استخدام البكتيريا أجروباكتيريم *Agrobacterium* كوسيلة لإدخال الچين المنقول (T.G.) إلى النبات حيث تحتوى البكتيريا على البلازميد المعاد توليفه والذى يحتوى على الچين المنقول والچين المخبر (R.G.) وهو چين المقاومة للمضاد الحيوى النيوميسين (Neomycin) حيث تضاف هذه البكتيريا إلى النسيج النباتى (Plant tissue) النامى على البيئة الغذائية ويمكن استخدام كلا من طريقة الكالس (A) او طريقة البيئة السائلة (B) .

ثالثاً: تكنولوچيا أداة القذف Particle Bombardment Technology

من الوسائل العملية الأخرى المستخدمة لإدخال الچين المنقول (T.G.) فـى الأنـسجة أو الخلايا النباتية هى نفخ (Blast) الچين المنقول أو الـDNA المرغوب خلال الجـدر الخلويـة النباتية بواسطة أداة قذف دقيقة (Particle gun) وتستخدم هذه الطريقة في كل الأنـواع النباتيـة المختلفة. والفكرة الأساسية لهذه الطريقة تعتمد على حمل الچين المنقول أو قطعـة الـDNA المرغوبة بواسطة جزيئات معدنية ميكروسكوبية والتى تطلق بواسطة أداة قـذف فـى النـسيج النباتى حيث تنفذ هذه الجزيئات من خلال الجدر الخلوية النباتية (شكل ٦٩)

وتستخدم هذه الطريقة بنجاح فى كل الأنواع النباتية وليست متخصصة لنوع نباتى معـين كما تستخدم أيضاً فى إدخال الچين المنقول فى الأنسجة الحيوانية للحصول على حيوانات معدلة چينياً(.Transgenic animals (T.G.A وتتلخص إستعمال هذه الطريقة فى الخطوات التاليه:

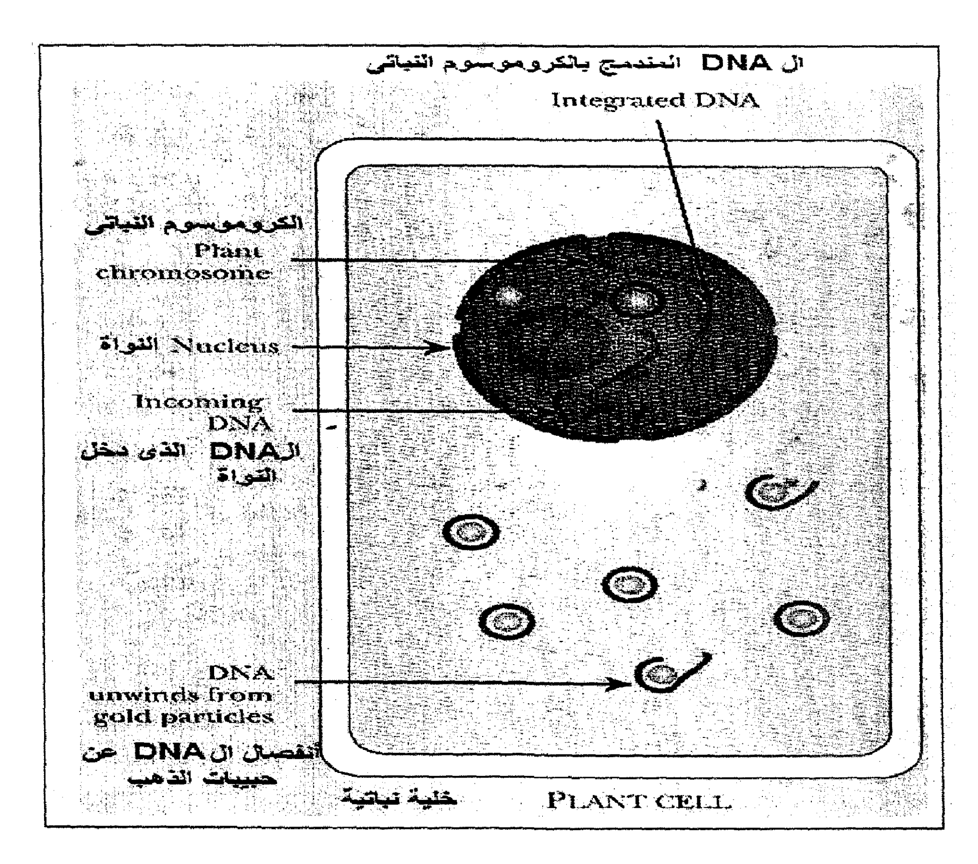
١- عزل قطعة صغيرة من نسيج الأوراق أو قطعة من الكالس (Callus) من النبات تحت الدراسة وتوضع فى طبق بترى (Petri dish) يحتوى على البيئة الغذائيـة المناسـبة ويجرى ذلك فى غرفة زراعة الأنسجة مفرغـة الهـواء (Vacuum chamber) .

٢-تجهيز الچين المنقول بإضافة البروموتور المناسب له وكذلك إضـافة الچـين المخبـر (.R.G) وبعض العناصر المعززة (Enhancers) وهى تتابعات نيوكليوتيدية محددة من الـDNA والتـى تعـزز التعبيـر الچينـى للچـين المنقـول (.T.G).

٣-يغلف هذا الچين المنقول بعناصره الأخرى بحبيبات ميكروسكوبية من الذهب (Gold) أو التنجستين (Tungsten) ويفضل استعمال حبيبات الذهب لأن حبيبات التنجـستين لهـا بعض التأثير السام لبعض الأنواع النباتية.

٤-يقذف هذا الچين المنقول بمكوناته فى النسيج النباتى بواسطة تكنولوچيا أداة القذف (Particle bombardment) فى صورة حبيبات.

٥-بعد دخول هذه الحبيبات إلى سيتوبلازم الخلية النباتية ينفصل الچين المنقول من حول حبيبة الذهب الحامله له وبعد ذلك يدخل الچين المنقول بمكوناته إلى النواة ويحدث له إدماج بنجاح فى أحد كروموسومات الخلية النباتية.



شكل (٦٩): استخدام أداة القذف (Particle Bombardment) فى قذف حبيبات الذهب الميكروسكوبية الدقيقة والتى تحمل الچين المفقود داخل أحد كروموسومات الخلية النباتية العائلة حيث أنه بعد دخول هذه الحبيبات الخلية العائلة ينفصل الچين المنقول عنها والذى يدخل النواة ويحدث له اندماج بنجاح فى أحد كروموسومات الخلية النباتية .

اكتشاف الچين المنقول Detection of Transgene (T.G.)

السؤال الذى يطرح نفسه هو كيف يمكننا اكتشاف ومعرفة الخلايا الهدف التى حصلت على الچين المنقول (T.G.) ؟ . من الناحية العملية يمكن اكتشاف الچين المنقول باضافة الچين المخبر (R.G.) إلى الچين المنقول ومن هذه الچينات المخبره المستخدمه على نطاق واسع ما يلى:

١- الچين المخبر npt (*npt* Reporter gene) وهذا الچين المخبر ينتج إنزيم نيوميسين فوسفوترانسفيريز (Neomycin phosphotransferase) الذى يثبط نشاط المضاد البكتيرى الحيوى Neomycin باتصاله بمجموعة الفوسفات بالإنزيم وعلى ذلك فإن الخلايا التى حصلت على الچين المنقول والچين المخبر معاً لا تموت عندما يضاف هذا المضاد الحيوى إلى البيئة الغذائية مما يسمح بالإنتخاب المباشر لها وبالتالى الحصول على الخلايا المتحولة وراثياً بينما تموت الخلايا الأخرى.

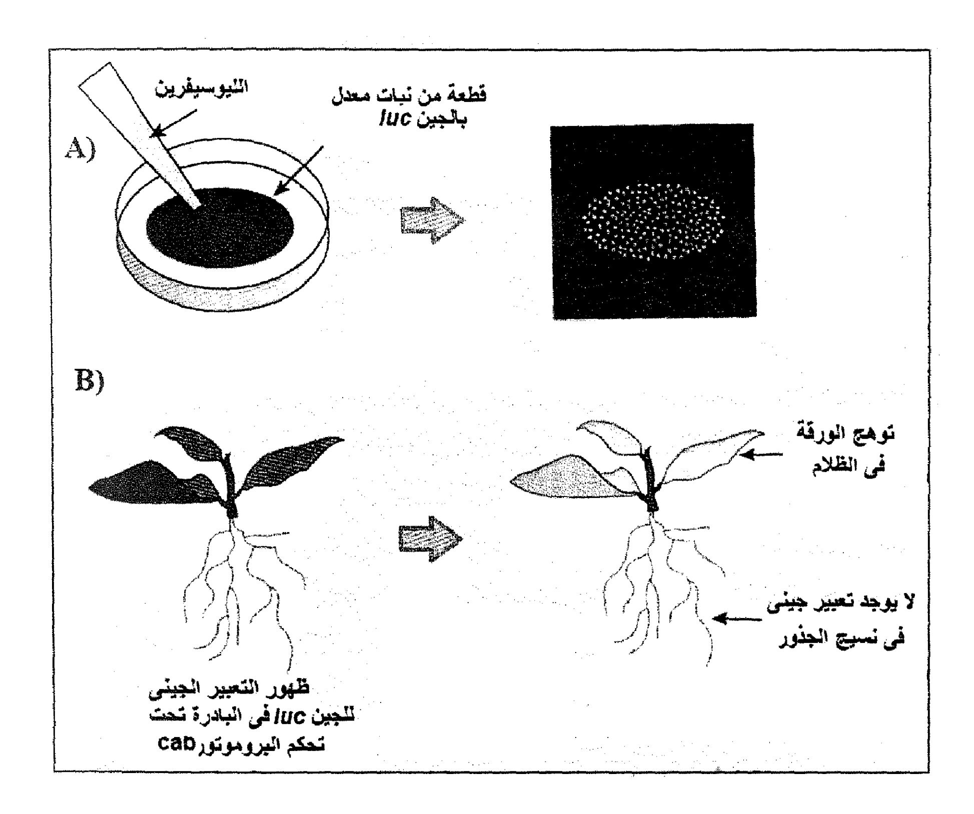
٢- الچين المخبر luc (*luc* gene) وهذا الچين المخبر ينتج إنزيم ليوسيفيريز (Luciferase) والذى يطلق ضوء عندما تحتوى البيئة الغذائية على مادة تفاعله الليوسيفرين (Luciferine). ويسمى هذا الچين المخبر فى الكائنات حقيقية النواة باسم (*luc* gene) بينما يسمى باسم (*lux* gene) فى الكائنات غير حقيقية النواة . وعلى الرغم من أن كلاً الإنزيمين اللذان ينتجهما هذين الچينين يطلقان ضوء إلا أن الطبيعة الكيميائية لمادة تفاعلهما الليوسيفرين (Luciferin) مختلفة (شكل ٧٠).

وعند استخدام هذا الچين المخبر سواء الچين (*luc* gene) أو الچين (*lux* gene) فإنه إذا تم بنجاح دخول الچين المنقول والچين المخبر إلى الخلية النباتية الهدف يحدث انبعاث للضوء إذا أضيفت مادة تفاعلهما الليوسيفرين إلى البيئة الغذائية، وعلى الرغم من أن مستوى التعبير الچينى لهذا الچين المخبر يكون واضحاً والذى يتمثل فى الإنتاج الكبير لهذا الإنزيم والذى يمكن مشاهدته بالعين المجرده إلا أنه عادة ما تكون كمية الضوء المنبعثة صغيرة والتى يمكن التحقق منها ومشاهدتها باستخدام أجهزة اليكترونية حساسه مثل جهاز Scintillation counter وهو عباره عن خلية ضوئية حساسه أو بواسطة CCD كاميرا (CCD Camera).

ويمتاز هذا الچين المخبر (R.G.) سواء الچين (*luc* gene) أو الچين (*lux* gene) أن البروتين الذى ينتجه أى من الچينين والذى يتركب منه إنـــزيم الليوســـيفيريز (Luciferase) لا يكون ثابت لفترة طويلة فى النبات إلا أن الكمية الفعالة من هذا الإنزيم تتلازم مع مستوى التعبير الچينى لأى من الچينين السابقين عند أى وقت. كذلك يمكن استخدام هذا الچين المخبر لإختبـــار نشاط بروموتور معين ، فعلى سبيل المثال إذا كان البروموتور cab (Cab promoter) يـــتحكم فى التعبير الچينى للچين (*luc* gene) فإن إنزيم الليوسيفيريز سوف ينتج فقط عندما يعمـــل هـــذا البروموتور . وعلى ذلك فإن نبات الارابيدوبسس المعدل چينياً (T.G.P.) والذى يحتـــوى علـــى الچين المخبر *Luc* gene أو *lux* gene فى وجود البروموتور (Cab promoter) سوف ينبعـــث منها ضوءاً من إنزيم الـــ Luciferase فى الأنـــسجة التـــى يحـــدث فيهـــا التمثيـــل الـــضوئى (Photosynthesis) وهى الظروف الطبيعية لتحفيـــز البروموتـــور النبـــاتى (Cab promoter) وبمجرد النجاح فى الحصول على الخلايا التى ظهر فيها التعبير الچينى لهـــذا الچـــين المخبـــر (R.G.) فإنـــه يمكـــن اكتـــشافها وتنميتهـــا للحـــصول علـــى نباتـــات كاملـــة معدلـــة چينيـــاً Transgenic plants (T.G.P.)

استئصال الچين المخبر **Excision of Reporter Gene (R.G.)**

من بين أهم مخاوف استخدام تكنولوچيا النباتات المعدلة چينياً (T.G.P.) هى استخدامها للچين المخبر (R.G.) لاكتشاف الچين المنقول (T.G.) وخصوصاً عندما يكون هذا الچين المخبر هو چين المقاومة لأحد المضادات الحيوية وذلك لتخوف عديد من المستهلكين من وجود الچين المخبر فى المواد الغذائية الناتجة من النباتات المعدلة چينياً. ومع ذلك أصبح متاحاً حالياً أنظمة وراثية يمكن استخدامها لاستئصال الچين المخبر (R.G.) بعد إدماج الچين المنقول (T.G.) فى چينوم (DNA) النبات المعدل چينياً ومن بينها النظام المعروف باسم Cre/Lox P. فالبكتريوفاج T_2 يهاجم البكتيريا *E. coli* بصورة طبيعية. وهذا البكتريوفاج يحتوى على نظام بسيط للتوليف الوراثى (Genetic recombination) يعرف باسم Cre / Lox P system والذى يتركب من:



شكل (٧٠): يوضح استعمال إنزيم الــ Luciferase المخبر فى الأنسجة النباتية (Plants tissues) الأنسجة النباتية التى تحمل الچين *luc* gene كچين مخبر ينتج الإنزيم Luciferase الذى يبعث لون أزرق blue light فى البيئة الغذائية عندما توجد مادة تفاعله الليوسفرين (Luciferin) :

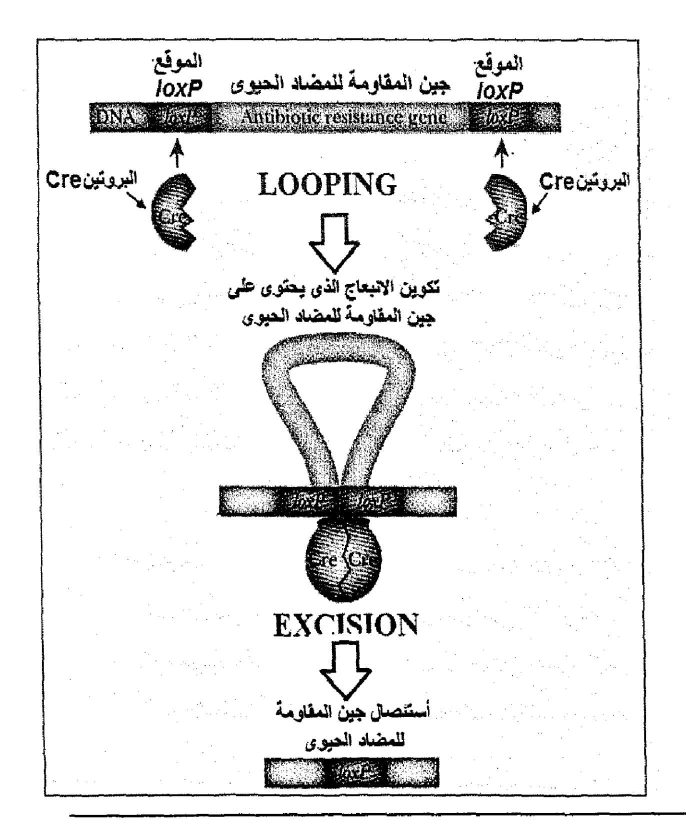
A. الجزء الوسط من ورقة (Leaf disk) نباتات معدلة چينياً (T.G.P.) بالچين *luc* gene المشاهد بالخلية الضوئية.

B. ظهور التعبير الچينى للچين *luc* gene فى بادره فى وجود البروموتور التحفيزى وهو البروموتور (Cab promoter) .

١- الچين Cre والذى يقوم بإنتاج البروتين (Cre) وهو عبارة عن إنزيم ريكمبينيز (Recombinase) الذى يسبب إعادة توليف الــDNA عند تتابع نيوكليوتيدى معين يعرف باسم Lox P.

٢- التتابع النيوكليوتيدى Lox P والذى يتركب من ٣٤ زوج من النيوكليوتيدات والذى يتعرف عليه البروتين (Cre).

ومن الناحية العملية لإستئصال الچين المخبر (R.G.) من النباتات المعدلة چينياً يجب إضافة الموقع Lox P على جانبى الچين المخبر. وعندما يحدث تنشيط لإنزيم الــ Recombinase فإنه يقوم بتجميع الموقعين Lox P معاً وإزالة الچين المخبر كما هو مبين فى (شكل ٧١).



شكل (٧١):
يوضح استئصال الچين المخبر (Reporter gene) بواسطة النظام cre/lox P system حيث يتعرف إنزيم الــ Recombinase على موقع التعرف lox P على جانبى الچين المخبر ويقوم بتجميع (Recombine) الموقعين lox P معاً واستئصال الچين المخبر.

ولاستئصال الچين المخبر (.R.G) من النباتات المعدلة چينياً فإنه يجب إعادة تكوين البلازميد المعاد توليفه (.R.P) والذى سوف يستخدم فى حمل ونقل الچين المنقول (.T.G) بحيث يجب أن يحتوى على المكونات التاليه :

١- الچين المنقول Transgene (T.G.)

٢- الچين المخبر Reporter gene (R.G.)

٣- الموقعين Lox P على جانبى الچين المخبر (.R.G)

٤- المكونات الأساسية الأخرى مثل وجود چينات العدوى (*vir* genes).

ويجرى إحلال كل من الچين المنقول والچين المخبر والموقعين lox P محل الچينات التى تقوم بإنتاج الهرمونات النباتية الموجودة فى القطعة T-DNA من البلازميد Ti-plasmid وبذلك يحتوى هذا البلازميد المعاد توليفه (.R.P) على كل المتطلبات اللازمة لحدوث العدوى للخلية النباتية وكذلك إنتقال القطعة T-DNA المعاد توليفها بالچينات السابقة بصورة طبيعية إلى الخلية النباتية مما يسبب حدوث التحول الوراثى لها بالچين المنقول وإنتاج نباتات معدلة چينياً تحتوى على الچين المخبر والذى يحدث له استئصال بعد ذلك ويفقد فى السيتوبلازم أو يتم تكسيره أثناء الانقسام الميتوزى أو الميوزى وذلك لعدم إحتوائه على منطقة منشأ التضاعف وبذلك نحصل فى النهاية على نباتات معدلة چينياً تحتوى على الچين المنقول فقط. ولإنتاج النباتات المعدلة چينياً والتى لا تحتوى على الچين المخبر يكون باتباع الخطوات التاليه (شكل ٧٢):

١- التهجين بين نباتين معدلين چينياً أحدهما النبات الأول والذى يحتوى على كل من الچين المنقول والچين المخبر والموقعين Lox P على جانبى الچين المخبر فى أحد كروموسومات هذا النبات والنبات الثانى يحمل الچين Cre الذى ينتج إنزيم الريكمبينيز والذى تؤخذ منه حبوب اللقاح وتوضع على مياسم النبات الأول.

٢- تزرع البذور الناتجة من هذا التهجين وتختبر النباتات الناتجة لمدى حساسيتها للچين المخبر (R.G.) والذى قد يكون چين المقاومة للمضاد الحيوى النيوميسين (neo gene).

٣- إذا وجد البروتين (Cre) فى أحد نباتات النسل فإن الچين المخبر سوف يحدث له استئصال وسوف يفقد أثناء النمو. هذا النبات ينتج حبوب لقاح تحتوى على الچين المنقول والچين Cre ولكنها لا تحتوى على الچين المخبر وهو چين المقاومة للمضاد الحيوى (neo gene)

٤- إذا أُجرى تلقيح آخر بين هذا النبات المعدل چينياً ونبات طبيعى (Wild-type) فإن بعض النسل الناتج سوف يحتوى على الچين المنقول ولكن ينقصه الچين (Cre) وباستخدام طريقة وراثية مثل التى تضمن أن النبات النهائى المعدل چينياً سوف يحتوى على نسخة واحده (One copy) من الچين المنقول فإنه يمكن تحقيق هذا الهدف النهائى وهو الحصول على نبات معدل چينياً يحتوى على الچين المنقول فقط. ولقد ثبت أن هذه الطريقة أكثر سهولة ومفيدة وبالتالى فإن أى صنف نباتى جديد معدل چينياً والذى سوف يباع فى الأسواق على نطاق تجارى سوف يحتوى فقط على چين منقول واحد وهو الچين المرغوب.

شـكل (٧٢):
يوضح طريقة التلقيح Cross- pollination scheme لإزالة الچين المخبر (R.G.) غير المرغوب:

١-تؤخذ حبوب لقاح من النبات الذى يحمل الچين Cre gene وتوضع على مياسم النبات المعدل چينياً والذى يحتوى على الچين المخبر وهو چين المقاومة للمضاد الحيوى.

٢-ظهور البروتين cre protein فى النسل الناتج سيؤدى لاستئصال (Excision) الچين المخبر.

٣-هذه النباتات التى فقدت الچين المخبر تلقح بنباتات برية (Wild-type plants) وسوف يحدث الانعزال المندلى الطبيعى فى النسل وبالتالى سوف يحتوى بعض النسل الناتج من هذا التلقيح على الچين cre gene والبعض الآخر من النسل سوف لا تحتوى على الچين cre gene وهذه النباتات يحافظ عليها لاستعمالها بعد ذلك.

نقل حبوب اللقاح
1
X
نبات ذرة يحمل جين المقاومة للمضاد الحيوي محصورا بين الموقعين loxP بالاضافة للجين المنقول
نبات ذرة يحمل الجين Cre
2
غربلة النباتات لمعرفة المحتوية منها على البروتين Cre
نقل حبوب اللقاح
3
X
نبات برى طبيعي
البروتين Cre يزيل الجين المخبر
غربلة النباتات الناتجة للحصول على النباتات المعدلة جينيا والتي تحتوي على الجين المنقول ولا تحتوي على الجين Cre والجين المخبر

تربية النباتات المعدلة چينياً وإختبارها

Plant Breeding of Transgenic Plants and Testing

تعتبر خطوة الحصول على نباتات معدلة چينياً (T.G.P.) خطوة صغيرة نسبياً بالمقارنة للخطوات التى يتم من خلالها تربية وتقييم النباتات المعدلة چينياً حيث تستغرق وقتاً طويلاً ويرجع ذلك للأسباب التاليه:

١- إختلاف مستوى التعبير الچينى للچين المنقول (T.G.) والذى يعتمد على عدد الچينات المنقولة فقد تحتوى النباتات المعدلة چينياً على عديد من النسخ لنفس الچين .

٢- موقع الچين المنقول فى الچينوم (DNA) النباتى والذى يؤثر كثيراً على التعبير الچينى له. فإذا حدث إدماج للچين المنقول فى منطقة هتروكروماتين من الكروموسوم النباتى فإنه يوجد احتمال كبير أن يكون هذا الچين المنقول ساكن ولا يحدث له تعبير چينى حتى ولو كان مزوداً ببروموتور قوى بينما إذا حدث إدماج للچين المنقول بالقرب من چين كروموسومى نشط فإنه من المحتمل أن يبدى أعلى مستوى من التعبير الچينى. كذلك يجب الأخذ فى الاعتبار عند تقييم النباتات المعدلة چينياً النقاط التاليه:

١- هل يسبب الچين المنقول (T.G.) تأثيرات ضاره جانبية على النبات المعدل چينياً؟

٢- هل يعمل الچين المنقول كما هو متوقع؟

٣- هل يؤثر الچين المنقول على البيئة الطبيعية (Ecosystem)

والإجابة على هذه الأسئلة تعتمد على كل چين منقول بصورة فردية. وإذا لم توجد أى تأثيرات ضارة جانبية فإنه تجرى الخطوات الطويلة فى تربية النباتات المعدلة چينياً ونقل الچين المنقول من النبات التجريبى إلى نبات آخر يعطى محصولاً مرتفعاً. ونظراً لأن معظم الأبحاث التى تجرى لإنتاج نباتات معدلة چينياً تستخدم الأصناف النباتية القديمة والتى تعتبر جيدة فى استخدامها معملياً إلا أنها لا تنتج كميات كبيرة من البذور فى وحدة المساحة (هكتار) أو أنها

تكون شديدة القابلية للإصابة بالأمراض النباتية والأكثر من ذلك كما ناقشنا سابقاً أن إكثار النباتات المعدلة چينياً عن طريق زراعة الأنسجة ربما تسبب بنفسها حدوث الطفرات فى الچين المنقول وللتغلب على كل هذه العقبات فانه يجب تربية النباتات المعدلة چينياً بواسطة طرق التربية التقليدية والتى من خلالها يتم نقل الچين المنقول من النبات التجريبى المعدل چينياً إلى أصناف نباتية عالية المحصول والتى تستخدم بالفعل على نطاق تجارى بإتباع الخطوات التاليه:

١- تؤخذ حبوب اللقاح من النبات التجريبى المعدل چينياً والذى يحتوى على الچين المنقول وتوضع على مياسم نباتات صنف يعطى محصولاً مرتفعاً.

٢- تحصد وتجمع البذور الناتجة من التلقيح السابق ثم يجرى زراعتها لإنتاج نباتات الجيل الأول F_1.

٣- إنتخاب النباتات التى تحتوى على الچين المنقول فعلى سبيل المثال إذا كان الچين المنقول يجعل النباتات مقاومة لأحد مبيدات الحشائش (Herbicide) فإنه يجب رش نباتات الجيل الأول (F_1) بهذا المبيد والذى يسبب قتل النباتات غير المعدلة چينياً بينما تبقى وتعيش النباتات المعدلة چينياً.

٤- تستخدم طريقة التربية الرجعية (Backcross breeding) باستخدام حبوب لقاح من نباتات الجيل الأول F_1 وتلقيحها عكسياً (backcross) بالأب الأصلى الذى يعطى محصولاً مرتفعاً.

٥- زراعة البذور الناتجة من التلقيح السابق وإنتخاب النباتات التى تحتوى على الچين المنقول بنفس الطريقة السابقة وتعرف هذه النباتات بالجيل الثانى (F_2).

٦- تتكرر خطوات التلقيح الرجعى إلى الأب الأصلى مرتفع المحصول بكل خطواتها لمدة أربعة أو خمسة سنوات وبهذه الطريقة من التربية الرجعية سوف نضمن أن حوالى ٩٨% من الچينات الموجودة فى النبات النهائى والمعدل چينياً هى چينات الأب الأصلى مرتفع المحصول بينما باقى الچينات تكون من النبات التجريبى المعدل چينياً.

ونظراً لأن هذه الطريقة من التربية تأخذ كل الصيف لكل جيل بالنسبة لكل من نبات الذرة وفول الصويا والقطن ولذلك فإنها تستغرق عدد من السنين يصل إلى ستة سنوات لإتمامها. وبمجرد الإنتهاء من طريقة التربية الرجعية ونقل الچين المنقول للصنف المناسب تجرى الاختبارات الحقلية لتقييم تأثير الچين المنقول على النمو وكمية المحصول وبعض الصفات الهامة الأخرى وكذلك المقاومة للأمراض النباتية . ويجب أن تجرى هذه الاختبارات الحقلية لعدد من السنين وفى مناطق مختلفة جغرافياً من حيث طبيعة التربة وطريقة الرى سواء بالطريقة العادية أو باستخدام مياه الأمطار . وهذه الاختبارات الحقلية تأخذ أيضاً عدد من السنين وفى نهاية المطاف يقوم مربى النبات بانتخاب النباتات التى تعطى أعلى محصول وأكثرها مقاومة للآفات الحشرية والأمراض النباتية وتستبعد النباتات الأخرى ولا تزرع مرة ثانية.

وقبل تداول واستعمال الأصناف النباتية الجديدة والمعدلة چينيـاً (T.G.P.) علـى نطـاق تجارى يجب اعتمادها من الهيئات والمؤسسات العلمية الحكومية والتى تنظم كل مراحل عمليات اعـادة بنـاء هـذه الچينـات المنقولـة حيـث تـنظم الهيئـة الدوليـة للأمـان الحيـوى (International committee for biosafety) كيفية تداول (Manipulation) الچينات المنقولـة عند تكوين النباتات المعدلة چينياً سواء عن طريق البكتيريا أجروبـاكتيريم *Agrobacterium* أو البكتيريا *E. coli* أو عن طريق النبات نفسه وعادة ما تكون هذه الهيئة على اتصال بالجامعـات والشركات التى يجرى بها إنتاج النباتات المعدلة چينياً وكل هذه الهيئات يتابعها المعهد الـدولى للصحة العامة (International Institute of Health) والذى يحدد البيئة التى يجرى فيها تنميـة النباتات المعدلة چينياً سواء كانت معامل أو صوب نباتية ولإجراء الاختبـارات الكليـة علـى النباتات المعدلة چينياً فإنه يجب أن يوافق على خطة هذه الاختبارات الحقلية مؤسـسة الخدمـة التفتيـشية لـلـصحة الحيـوان والنبـات فـى الولايـات المتحـدة (Animal and Plant Health Inspection Service of the U.S.) كذلك يجب أن يقدم العلمـاء بيانات ومعلومات كاملة ومكثفة عن الچين المنقول (T.G.) وتأثيره الكـامن (Potential effect) على النبات وعلى النظام البيئى (Ecosystem) وتوجد هيئتين أخرتين يجب أن توافق على

النباتات المعدلة چينياً. فإذا كانت النباتات المعدلة چينياً تنتج ناتج غذائى مثل الذرة فـإن هيئـة الغذاء والدواء (Food and Drug Administration) يجب أن تجرى اختبارات صـارمة مـن حيث الحساسية التى قد تسببها النباتـات المعدلـة چينيـاً كـذلك تقـوم هيئـة حمايـة البيئـة (Environmental Protection Agency) أيضاً بتقييم النباتات المعدلة چينياً من حيث تأثيراتهـا الكامنة على البيئة والحيوانات والحشرات التى تعيش فى حقول الفلاحين.

النباتات المعدلة چينياً والمقاومة لمبيد الحشائش

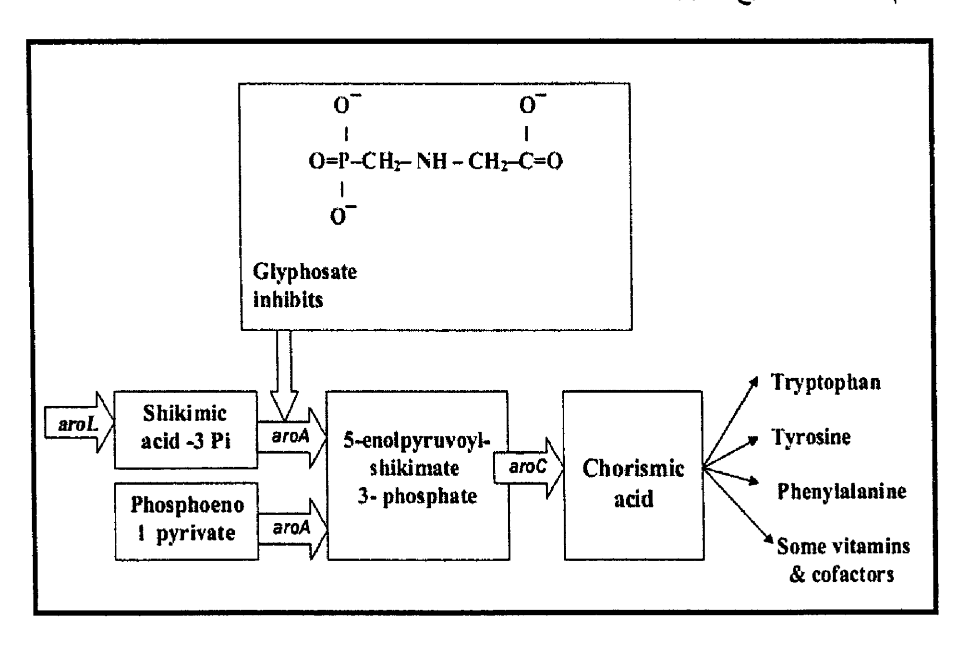
Transgenic Plants with Herbicide Resistance

تكلف مبيدات الحشائش الكيميائية الفلاحيين فى العالم أكثر من ٢ بليون دولار سنوياً وبالرغم من ذلك يفقد ١٠% من المحصول بسبب الحشائش وأحد المشاكل التى تواجه استخدام مبيدات الحشائش الكيميائية أنها لا تميز بين نباتات المحصول النباتى والحشائش وبالتالى فإنها تقتل أى نبات تلامسه ومن بين أحد الحلول المستخدمة هو جعل نباتات المحصول النباتى مقاومة وراثياً لمبيد الحشائش.

ومن أفضل مبيدات الحشائش الموجودة فى الأسواق هو مبيد الجليفوسات (Glyphosate) والذى تنتجه شركة (Monsante) تحت اسم تجارى Round-up. وهذا المبيد صديق للبيئة لأنه سريعاً ما يتحول أو يتكسر فى البيئة إلى مركبات غير سامة. وجزئ الجليفوسات هو أحد مشتقات الأحماض الأمينية الشبيهه بالجليسين (Glycine). وهذا المبيد يسبب قتل النباتات عن طريق قفل أو تثبيط الممر التخليقى الحيوى للأحماض الأمينية الأروماتية وهى الفينايل الانين (Phenylalanine) والتيروسين (Tyrosine) والتربتوفان (Tryptophan) (شكل ٧٥).

ويثبط هذا المبيد أحد الإنزيمات الخاصة فى هذا الممر التخليقى الحيوى وهو إنزيم 5-Enolpyruvoyl Shikimate-3-Phosphate Synthase (EPSPS) والذى يتواجد فى البلاستيدات الخضراء وهذا الإنزيم (EPSPS) ينتجه الچين (aro A gene). ويوجد هذا الإنزيم بصورة طبيعية فى النباتات والفطريات والبكتيريا ولكنه لا يوجد فى الخلايا الحيوانية ، وعلى

ذلك فإن هدف هذا المبيد هو هذا الإنزيم والذى لا يوجد فى الحيوانات ومنها الإنسان ولذلك يجب أن يتناول الإنسان وكذلك الحيوانات الأخرى هذه الأحماض الأمينية الأروماتية السابقة فى طعامهم لأنها لا تستطيع تخليقها.



شكل (٧٣): يوضح تثبيط مبيد الحشائش الجليفوسات Glyphosate لإنزيم الـ EPSPS فى الممر التخليقى الحيوى للأحماض الأمينية الأروماتية

وعند رش النباتات بمبيد الجليفوسات فإنه يدخل إلى البلاستيدات الخضراء ويرتبط بإنزيم EPSPS ويقفل الممر التخليقى الحيوى لتخليق الأحماض الأمينية الأروماتية وبالتالى تجوع النباتات بصفة أساسية حتى تموت. ونظراً لأن تحسين مقاومة النباتات بطريقة مباشرة لهذا المبيد هى عملية صعبة أتخذ العلما طرق أخرى مختلفة. ونظراً لأن هذا الإنزيم (EPSPS) يوجد فى

البكتيريا أيضاً إتجه العلماء لإكتشاف إنزيم الـــ EPSPS مقاوم لتأثير مبيد الجليفوسات ولكنه فى نفس الوقت يظل قادر على تخليق الأحماض الأمينية الأروماتية على النحو التالى :

١-عزل سلالة طفرية من البكتيريا *Agrobacterium* مقاومة لتأثير مبيد الجليفوسات بطريقة مباشرة عن طريق تنمية هذه البكتيريا على بيئة غذائية تحتوى على هذا المبيد. هذه السلالة الطفرية من البكتيريا *Agrobacterium* تحتوى على إنزيم الـــ EPSPS المقاوم لتاثير المبيد ولكنه ما يزال فعال وظيفياً. ووجد أن هذا الإنزيم الطافر يختلف عن الإنزيم الطبيعى فى إحلال حامض أمينى واحد. وهذا الجين الطافر هو نسخة معدلة من الجين (aro A gene).

٢-استخدام البلازميد البكتيرى Ti-plasmid كوسيلة لنقل وإدخال هذا الجين الطافر (aro A gene) للنباتات عن طريق إعادة توليف هذا البلازميد وتكوين بلازميد معاد توليفه (R.P.) يحتوى على (شكل ٧٤)

أ- الجين الطافر (aro A gene)

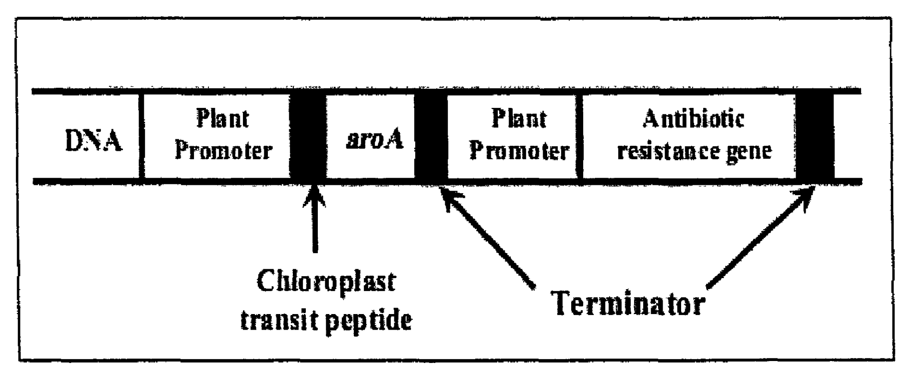
ب- بروموتور نباتى (Plant promoter)

ج- التتابع النيوكليوتيدى النباتى لإنهاء النسخ

د- الجين المخبر Reporter gene (R.G.) وهو جين المقاومة لأحد المضادات الحيوية لتسهيل انتخاب النباتات المعدلة جينياً (T.G.P.).

ه- قطعة من الـــ DNA الصغيرة والتى تنسخ وتترجم إلى ببتيــدات صـــغيرة خاصـــة بالبلاستيدات الخضراء نظراً لأن هذا الإنزيم (EPSPS) يتواجد فى البلاســتيدات الخـــــضراء حيـــــث تـــــرتبط هـــــذه الببتيـــــدات الـــــصغيرة (Small chloroplast transit peptide) فى الطرف الذى يحتوى علـــى مجموعـــة الأمينو من الإنزيم (EPSPS) والتى توجه دخوله إلى البلاستيدات الخـــضراء ثـــم تنفصل بعد ذلك عن الإنزيم ويدخل الإنزيم الفعال (EPSPS) فقط إلى البلاستيدات.

٣-استخدام مزارع الأنسجة والبكتيريا أجروباكتيرم *Agrobactrium* التي تحتوى على البلازميد المعاد توليفه بالصورة السابقة لإدخال الچين الطافر(aro A gene) والعناصر الأخرى السابقة إلى الخلية النباتية والحصول فى النهاية على النبات المعدل چينياً بالچين الطافر (aro A gene). ولقد أمكن الحصول على أصناف نباتية جديدة معدلة چينياً تحتوى على الچين الطافر (aro A gene) مثل القطن والكانولا (Canola) بهذه الطريقة بينما استخدمت طريقة أداة القذف (Gene gun) لإدخال الچين الطافر (aro A gene) إلى نبات فول الصويا للحصول على صنف جديد من فول الصويا معدل چينياً يحتوى على الچين الطافر (aro A gene).



شكل (٧٤) :يوضح جزء من البلازميد Ti-plasmid المعاد توليفه والذى حدث به احلال للچين aro A بالقطعة T-DNA بدلاً من الچينات التى تنتج الهرمونات النباتية

ولقد استخدمت طريقة أخرى لجعل الچين النباتى الطبيعى (aro A gene) وكذلك الچين البكتيرى (aro A gene) مقاوم لتأثير مبيد الحشائش جليفوسات (Glyphosate) من خلال تحوير التتابع النيوكليوتيدى للچين (aro A gene) فى نبات الذرة معملياً (In vitro) وأمكن الحصول على الچين المتحور (Altered aro A gene) من نبات الذرة والذى ينتج إنزيم الـــ (EPSPS) مقاوم لتأثير مبيد الحشائش الجليفوسات واستخدمت أداة قذف الچين فى إدخال هذا الچين المتحور إلى نبات الذرة وأمكن الحصول على صنف جديد من الذرة معدل چينياً يحتوى على هذا الچين المتحور.

وعلى الرغم من أن مبيدات الحشائش الأخرى مثل مبيد السلفونايل يوريز (Sulfonylureas) والإيميدازولينونيز (Imidazolinones) لا تستخدم على نطاق تجارى واسع إلا أنه أمكن إنتاج نباتات معدلة چينياً مقاومه لتأثير اى منهما ويرجع تأثير هذين المبيدين فى قتل الحشائش إلى أن أى منهما يثبط إنزيم يلعب دوراً فى الممر التخليقى الحيوى للأحماض الأمينية الليوسين والايسوليوسين والڤالين ويختلف الإنزيم الطافر الذى ينتجه الچين الطافر المقاوم لتأثير أى من المبيدين عن الإنزيم الطبيعى غير المقاوم فى إحلال حامض أمينى واحد ولكنه يظل قادر على تخليق الأحماض الأمينية السابقة. كذلك أمكن إنتاج نباتات معدلة چينياً مقاومة لمبيد الحشائش الجليفوسينات (Glufasinate) الذى يثبط أو يقفل (Blocks) الممر التخليقى الحيوى للحامض الأمينى الجلوماتيك وأمكن الحصول على طفرة تنتج إنزيم مقاوم لتأثير هذا المبيد وتم إدخال هذا الچين الطافر إلى بعض المحاصيل النباتية.

<u>النباتات المعدلة چينياً والمقاومة للحشرات</u>

<u>Transgenic Plants with Insect Resistance</u>

على الرغم من أن الحشائش تعتبر ضارة ولكن الأكثر ضراراً وتكلفة هو مكافحة الآفات الحشرية والديدان الحلقية والأمراض النباتية الفطرية والڤيرسية. وانه من الممكن هندسة النباتات چينياً لتصبح مقاومة للآفات الحشرية والأمراض الفطرية والڤيرسية. ونظراً لأن طريقة رش النباتات بمبيدات الحشرات الكيميائية هي طريقة مكلفة جداً وخطيرة فى نفس الوقت فضلاً عن أن مبيدات الآفات الحشرية أكثر سمية على الإنسان من مبيدات الحشائش ويرجع السبب فى ذلك إلى أن عديد من الممرات البيوكيميائية الموجودة فى الحشرات توجد فى الإنسان وكذلك القوارض والطيور التى تعيش على المحاصيل الحقلية.

ومن حسن الحظ وجدت مواد سامة أو توكسينات (Toxins) طبيعية ومميتة للحشرات ولكنها غير ضارة بالثدييات. ومن أول الأمثلة على هذه المركبات السامة أو (التوكسينات الطبيعية) تلك التى تنتجها البكتيريا *Bacillus thuringiensis* وهى بكتيريا تعيش فى التربة ويعرف هذا المركب السام باسم (Bt toxin) ولقد استخدم فى رشه على نباتات محصول القطن والذرة للقضاء على يرقات دودة ورق القطن وكذلك ثاقبات الذرة الأوروبية واللذان يسببان

ضرراً كبيراً لكلا المحصولين. فالضرر الذى تسببه ثاقبات الذرة الأوروبية فإنه بالإضافة إلى تكلفة المبيدات الحشرية التى تستخدم فى مقاومتها والذى يصل إلى حوالى بليون دولار سنوياً فإنها تسبب أيضاً جعل نباتات الذرة المصابة بهذه الثاقبات قابلة للعدوى بالمواد السامة الفطرية والتى يكون لها تأثير ضار على الإنسان. وتنتج البكتيريا التابعة لجنس Bacillus جراثيم (Spores) تحتوى على بروتينات بلورية تعرف بالـــكرى بروتين (Cry protein) مفيده حيث أنه عندما تأكل يرقات الحشرات هذه الجراثيم يتكسر البروتين كرى (Cry) ويتحرر المركب السام المعروف باسم (Bt-toxin) والذى يرتبط بالأغشية المعوية لليرقات ويولد ثقوب تشل النظام الهضمى وبالتالى تموت اليرقات الحشرية (شكل٧٥).

والأنواع البكتيرية الأخرى التابعة لجنس Bacillus تنتج بروتينات بلورية مختلفة عن البروتين كرى (Cry) وقسمت فى البداية على أساس الأنواع الحشرية التى تقتلهاعلى النحو التالى:

١ – Cry I يسبب موت حشرات جنس Lepidoptera

٢ – Cry II يسبب موت حشرات جنس lipidopetra وحشرات جنس Diptera

٣ – Cry III يسبب قتل حشرات جنس Coleoptera

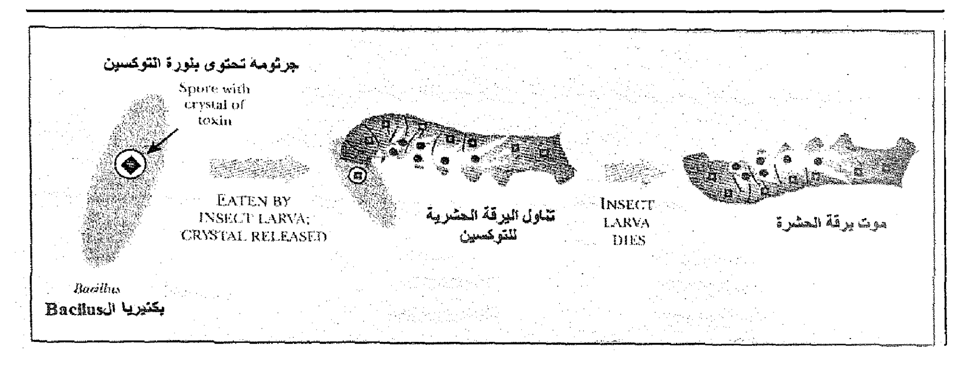
٤ – Cry IV يسبب قتل حشرات جنس Diptera.

ومع زيادة طرز البروتين كرى (Cry) المختلفة أصبح هذا التقسيم تقسيماً مبسطاً جداً. وبدلاً من رش النباتات بهذا المركب السام (Bt-toxin) لمقاومة الآفات الحشرية استخدم العلماء تكنولوجيا نقل الچين لإدخال الچين (Cry) إلى النباتات مباشرة فعندما أدخل الچين (Cry) إلى نباتات الطماطم كانت هذه النباتات المعدلة چينياً بهذا الچين مقاومة جزئياً ليرقات بعض الأنواع الحشرية. ومع ذلك فإن النباتات المعدلة چينياً بهذا الچين كانت تنتج مستوى منخفض من هذا المركب السام وذلك بسبب أن هذا الچين كان مأخوذاً من البكتيريا وأنه كان مصمماً على أن يظهر تعبيره فى البكتيريا وليس فى النباتات وعلى ذلك تم تحوير أو تعديل هذ الچين (Cry) لتعزيز تعبيره الچينى فى النباتات.

والمركب السام الأصلى (Bt toxin) هو عبارة عن بروتين كبير يحتوى على ١١٥٦ حامض أمينى على الرغم من أن ٦٥٠ حامض أمينى الأولى فى هذا البروتين السام تعتبر أهم الأحماض الأمينية الضرورية فى هذا البروتين والتى تسبب التأثير السام لهذا البروتين ، وعلى ذلك عُدل هذا الچين (Bt gene) لينتج الأحماض الأمينية الضرورية فى البروتين السام (٦٥٠ حامض أمينى) ومثل هذا التعديل فى هذا الچين يجعل إنتاج البروتين السام يحتاج إلى طاقة أقل فى إنتاجه.

والخطوة التاليه هى وضع هذا الچين المعدل تحت تحكم بروموتور ليعطى أعلى مستوى ثابت من التعبير الچينى لهذا الچين المعدل فى النباتات المعدلة چينياً (T.G.P.) وبعض البروموتورات المأخوذة من بعض الڤيروسات النباتية مثل ڤيرس (Cauliflower mosaic virus) تحقق هذا الغرض وتجعل هذا الچين المعدل يعطى عشرة أضعاف من البروتين السام فى النباتات المعدلة چينياً. والمحاصيل المعدلة بچين (Bt gene) مثل القطن والذرة لها عديد من المميزات بدلاً من رش الحقول بالمركب السام نفسه من بينها أن هذا المركب السام (Bt toxin) لا ينجرف بالرياح إلى مناطق أخرى وبالتالى لا يحدث تلوث لحقول زراعية أخرى.

واستخدام النباتات أو المحاصيل المعدلة چينيا تختزل كثيراً كمية مبيدات الحشرات المطلوبة، فعلى سبيل المثال فى عام ١٩٩٨ حدث انخفاض فى استخدام مبيدات الحشرات الكيميائية مقداره ٤٥٠٠٠٠ كيلوجرام التى كانت تستخدم فى مقاومة الآفات الحشرية التى تصيب القطن فقط فى الولايات المتحدة الأمريكية وعلى الرغم من ذلك فإن ٤٥% من القطن المنزرع كانت معدلة چينياً (T.G.P.) فقط.



شكل (٧٥): يوضح قتل يرقة الحشرة (Insect larvae) بواسطة المركب السام (Bt toxin) فى الخطوات التاليه:

١- وجود الجراثيم البكتيرية (Bacterial spores) التى تنتجها البكتيريا Bacillus فى الغذاء الذى تتناوله اليرقة .

٢- تحرر البروتين البلورى (Crystalline protein) بتكسير الجراثيم (Spores) والذى يتكسر داخل الأمعاء الوسطى لليرقة منتجاً المركب السام (Toxin) الذى يسبب قتل اليرقة.

النباتات المعدلة جينياً التى تتحمل الظروف البيئية القاسية

Transgenic plant tolerant for environmental stress

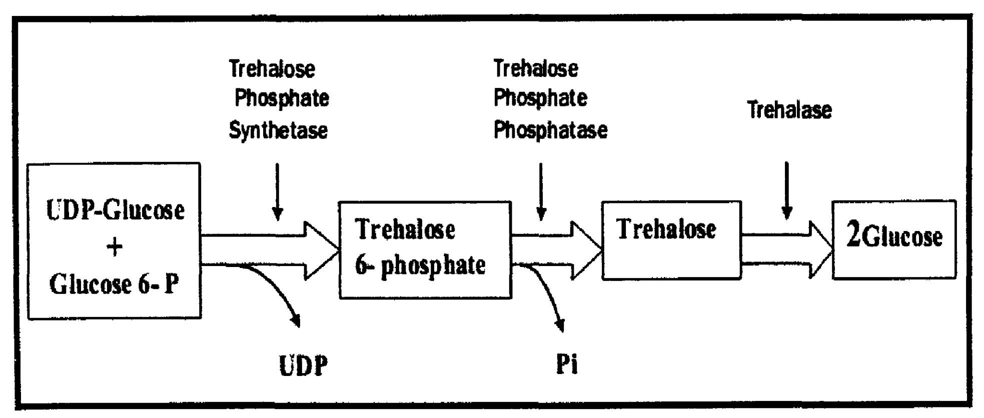
للنباتات قدرة كبيرة على التأقلم تحت الظروف البيئية المختلفة وذلك لأنها تمتلك عديد من الآليات تساعدها فى العيش والنمو تحت الظروف البيئية القاسية من الإجهاد المائى (Drought) وارتفاع نسبة الأملاح فى مياه الرى اللذان يعتبران من الظروف القاسية التى تواجهها المحاصيل النباتية فى نموها.

ولقد أوضحت الأبحاث أن النباتات التى تتحمل الإجهاد المائى وارتفاع نسبة الأملاح أن سكر التريهالوز (Trehalose) يحمى النبات أثناء الظروف القاسية. وسكر التريهالوز عبارة عن كربوهيدات مخزنة غير مختزلة وله القدرة على امتصاص وتحرر جزيئات المياه ويتم التخليق الحيوى لهذا السكر بواسطة إنزيمين هما:

١-إنزيم تريهالوز فوسفات سنيثتيز Trehalose phosphate synthetase.

٢-إنزيم تريهالوز ٦ فوسفات فوسفاتيز Trehalose 6-phosphate phosphatase.

حيث يبدأ هذا التخليق الحيوى لهذا السكر بمركب UDP-Glucose والمركب Glucose 6-P ينتهى هذا الممر التخليقى الحيوى بسكر التريهالوز. ثم يقوم إنزيم التريهاليز (Trehalase) بتكسير سكر التريهالوز إلى جزيئين من سكر الجلوكوز Glucose (شكل ٧٦).



شكل (٧٦): يوضح تخليق سكر التريهالوز (Trehalose) والإنزيمات التى لها دور فى هذا الممر التخليقى الحيوى حيث يوجد تفاعلين إنزيمين تؤدى إلى تكوين سكر التريهالوز هما :

١ – يقوم إنزيم Trehalose phosphate synthetase بالتفاعل التالى

UDP-Glucose + Glucose 6-P ⟶ Trehalose 6-phosphate

٢ – يقوم إنزيم Trehalose 6-phospate phosophatase بتحويل المركب السابق إلى سكر التريهالوز والذى يتحول إلى جزيئين من سكر الجلوكوز glucose بواسطة إنزيم التريهاليز (Trehalase).

نباتات الأرز المعدلة جينياً Rice Transgenic Plants

لجعل نباتات الأرز أكثر تحملاً للملوحة أو تحمل الإجهاد المائى أمكن تخليق جزيئات من الـــ DNA المعاد توليفها تحتوى على كل من:

١ – الچين A الذى ينتج الإنزيم Trehalose phosphate synthetase

٢ – الچين B الذى ينتج الإنزيم Trehalose 6-phosphate phosphatase

وتم استخدام البلازميد البكتيرى Ti-plasmid للبكتيريا أجروباكتيريم كحامل (Vector) لكلا الچينين السابقين لنقلهما وادماجهما فى چينوم (DNA) نبات الأرز لإنتاج نباتات أرز معدلة چينياً. ولقد وجد أن ادخال وادماج الچينين السابقين فى الچينوم النباتى لنباتات الأرز أن النباتات المعدلة چينياً بالچينين السابقين كانت أكثر تحملاً للتركيزات العالية من الأملاح فى مياه الرى وكذلك كانت أكثر تحملاً للأجهاد المائى ومع ذلك كانت نباتات الأرز المعدلة چينياً بالچينين السابقين والمضاف إليهما بروموتور يعمل بصورة مستمرة كانت متقدمة وعلى ذلك فإن نظام التعبير الچينى للچينات المنقولة سوف يؤثر على المحصله النهائية للمحصول. ونباتات الأرز المعدلة چينياً بالصورة السابقة لم تستخدم حتى الآن حقلياً ولكنها مازالت فى مراحلها التجريبية ، وبالرغم من ذلك فإنها تبشر بامكانية اكتشاف طرق جديدة أخرى لزيادة إنتاج الغذاء تحت الظروف البيئية القاسية.

إنتاج نباتات معدلة چينياً مقاومة للإصابة الڤيرسية

Production of transgenic plants resistant to virus infection

من بين الطرق العديدة التي كانت تستخدم لوقاية النباتات من الإصابة بالأمراض الڤيرسية تلك الطريقة التي اعتمدت على الظاهرة التي اكتشفها العالم H.H. McKinney وهي إمكانية تحصين النباتات من الإصابة بالأمراض الڤيرسية عن طريق تحصين النباتات بعدوها بسلالة ضعيفة من الڤيرس لتصبح مقاومة للإصابة بالسلالة القوية من نفس الڤيرس. وقد استعملت هذه الطريقة في تحصين وحماية نباتات الطماطم على المستوى التجاري في بريطانيا لوقاية نباتات الطماطم النامية في الصوب الزجاجية من الإصابة بڤيرس التبرقش(Tomato mosaic virus). ولقدأوضحت الأبحاث أن هذه المقاومة ترجع إلى دور بروتين الغلاف الڤيرسى للڤيرس المستخدم في التحصين والذي يعيق الإصابة بنفس الڤيرس النشط.

ولقد نجح العالم Powell Abel ومعاونيه في إدخال الچين الذي ينتج الغلاف البروتيني لڤيرس تبرقش أوراق الدخان (Tobacco mosaic virus) في خلايا نباتات الدخان النامية في مزارع لزراعة الأنسجة عن طريق استخدام البكتيريا *A. tumefaciens* التي تحمل البلازميد Ti-plasmid المعاد توليفه والذي يحمل هذا الچين وحصل على نباتات دخان معدلة چينياً تستطيع تخليق بروتين الغلاف

الڤيرسى بڤيرس تبرقش الدخان وكانت هذه النباتات المعدلة چينياً مقاومة وراثياً للڤيرس. وتتلخص الطريقة التي اتبعها هذا العالم في الخطوات التاليه:

١- تخليق وعزل الچين الذي ينتج الغلاف البروتيني الڤيرسى عن طريق استخدام النسخ العكسى لخيط الـ RNA الڤيرسى بواسطة إنزيم النسخ العكسي (Reverse transcriptase) لنسخ چين تخليق بروتين الغلاف الڤيرسى وتكوين خيط الـc-DNA ثم استخدام إنزيم DNA polymerase لبلمرة الـ DNA لتكوين خيط مزدوج من الـ DNA يمثل چين إنتاج الغلاف البروتيني الڤيرسى وبذلك استطاع الحصول على هذا الچين.

٢- إضافة التتابعات النيوكليوتيدية لبداية النسخ على شمال هذا الچين وإضافة كذلك التتابعات النيوكليوتيدية التي تمثل انتهاء نسخ الچين على يمين هذا الچين وتكوين الچين المعاد توليفه بالصورة المرغوبة.

٣- إدخال هذا الچين المعاد توليفه بالبلازميد Ti-plasmid في المنطقة T-DNA من هذا البلازميد بإحلاله محل الچينات التي تنتج الهرمونات المحدثة للورم.

٤- إدخال هذا البلازميد Ti-plasmid المعاد توليفه بالچين المرغوب إلى خلايا البكتيريا *A. tumefaciens* خالية من البلازميد Ti-plasmid وبذلك حصلوا على بكتيريا مكلونة clone بالچين المرغوب.

٥- إضافة هذه البكتيريا المكلونة بالچين المرغوب إلى مزارع خلوية لخلايا نبات الدخان قابلة للإصابة بمرض التبرقش وبذلك سوف تنتقل قطعة الـ T-DNA من البلازميد المعاد توليفه إلى الخلايا النباتية وتندمج بأحد الكروموسومات وبذلك حصلوا على نباتات دخان كاملة النمو معدلة چينياً تحمل چين إنتاج بروتين الغلاف الڤيرسى والتي كانت مقاومة لڤيرس التبرقش عند إصابتها بالڤيرس.

٦- هذه النباتات المعدلة چينياً بچين إنتاج بروتين الغلاف الڤيرسى كانت جميع خلاياها تحتوي هذا الچين ليس ذلك فقط ولكن النسل الناتج من تكاثر هذه النباتات المعدلة چينياً كانت تحمل أيضاً هذا الچين والذي أصبح صفة وراثية ثابتة في التركيب الچيني للنباتات المعدلة چينياً والمقاومة لڤيرس

تبرقش أوراق الدخان. ولقد نجحت هذه الطريقة في إنتاج نباتات معدلة چينياً مقاومة لبعض الڤيروسات منها:

أ – إنتاج نباتات طماطم معدلة چينياً بچين إنتاج بروتين الغلاف الڤيرسى والمقاومة وراثياً لڤيرس تبرقش أوراق الطماطم وتباع بذور هذه النباتات المعدلة چينياً بهذا الچين في الأسواق على نطاق تجاري.

ب– إنتاج صنف من البطاطس والمعدل چينياً بچين إنتاج بروتين الغلاف الڤيرسي والمقاوم لڤيرس الـ Zucchini Yellow Mosaic Virus ويباع هذا الصنف حالياً في الأسواق على نطاق تجاري.

ج– إنتاج صنف من الباباظ المعدل چينياً بچين إنتاج بروتين الغلاف الڤيرسي والمقاوم لڤيرس التبقع الحلقي في البابابظ (Papay ringspot virus) والذي يباع الآن تحت الاسم التجاري Rainbow.

إنتاج العقاقير الطبية بواسطة النباتات المعدلة چينياً

Production of protein drugs by transgenic plants

من بين تطبيقات التقنية الحيوية إنتاج عديد من العقاقير البروتينية الطبية الجديدة والتي وافقت عليها منظمة الصحة العالمية كما وافقت عليها أيضاً الوكالة المنظمة لاستخدام العقاقير الطبية في المملكة المتحدة وأوروبا. وهذه المنتجات الناتجة بواسطة التقنية الحيوية كانت باستخدام البكتيريا المعدلة چينياً أو الفطر المعدل چينياً أو باستخدام خلايا الثدييات المعدلة چينيا والنامية في مزارع خلوية.

واستخدام النباتات المعدلة چينياً لإنتاج بعض العقاقير البروتينية الطبية هو عمل رائد قامت به عدد من شركات التقنية الحيوية حيث أوضحوا أن النباتات المعدلة چينياً لهذا الغرض تكلفتها أقل نسبياً بالمقارنة لاستخدام المزارع الخلوية فضلاً عن أن النباتات المعدلة چينياً تستطيع تنفيذ التحورات المناسبة التي تحدث للبروتينات لكي تصبح فعالة وظيفياً والتي تتضمن إضافة الكربوهيدرات

والفوسفيلات أو مجاميع كيميائية أخرى للبروتينات والفشل في حدوث مثل هذه التحورات مع التفاعل مع البروتينات المستقبلة بالخلية أو أنها تسبب هدم لمثل هذه التحورات لبروتينات الكائنات حقيقية النواه يمنع هذه البروتينات ويصبح الدم خالياً منها بسرعة كبيرة.

ومازالت الأبحاث التي تجرى على النباتات لإنتاج نباتات معدلة چينياً تنتج البروتينات المرغوبة في مراحلها الأولى حيث أن معظم البروتينات التي تنتجها النباتات المعدلة چينياً تستخدم بغرض الأبحاث وليست لاستخدام الإنسان. ومع ذلك فقد حصلت إحدى شركات التقنية الحيوية على موافقة منظمة الصحة العالمية على تسويق مصل الدجاج والمنتج بواسطة المزارع الخلوية للخلايا النباتية المعدلة چينياً. ويواصل العلماء جهودهم في شركات التقنية الحيوية لإنتاج بعض الأمصال من خلال الجزء الذي يؤكل من النبات مثل الثمار والدرنات. وتعتبر هذه الوسيلة أقل تكلفة في توصيل المصل للدول النامية بدون تحديد موعد مسبق ومحدد لتخزين المصل في الثلاجات كما أنها وسيلة تحتاج إلى قليل من المهارات لاستخدام المصل.

ولقد تم بنجاح هندسة النبات بچين منقول ما ينتج جزء خاص من بروتين بكتيري يسبب إنتاج أجسام مضادة في الحيوانات. وكذلك استطاع العلماء والباحثين في جامعة أريزونا (Arizona) من إنتاج واختبار مصل يعطي عن طريق الفم للإنسان ضد ڤيرس التهاب الكبد الوبائي طرازB (Hepatitis B) والناتج من نباتات بطاطس معدلة چينياً. والچين الذي تم إدخاله في نباتات البطاطس المعدلة چينياً كان يحتوي على نفس التتابع النيوكليوتيدي لڤيرس الالتهاب الكبدي الوبائي طراز B والذي يستخدم كمصل عن طريق الحقن. وباختبار هذاالمصل وجد أن المتطوعين الذين تناولوا درنات البطاطس غير المطهية المعدلة چينياً بهذا الچين استطاعوا تكوين أجسام مضادة لڤيرس التهاب الكبد الوبائي طراز B بينما المتطوعين الذين تناولوا درنات البطاطس غيرالمطهية التي ينقصها هذا الچين لم يستطيعوا تكوين أجسام مضادة لڤيرس التهاب الكبد الوبائي طراز B. ومع ذلك لم يتم متابعة إنتاج هذا المصل بمثل هذه الطريقة لأنه يتطلب تناول البطاطس الخام غير المطهية. ولقد أوضحت هذه الدراسة ودراسات أخرى أن مثل هذه الأمصال الناتجة من النباتات المعدلة چينياً تسبب تنبيه الاستجابة المناعية في جسم الإنسان ولذلك فإن مثل هذه الأمصال التي تنتجها النباتات

المعدلة چينياً ويتم استخدامها عن طريق الجزء الذي يؤكل من النبات سواء كانت ثمار أو درنات مازالت تحت الدراسة.

ومنذ عام ١٩٩٢ وحتى عام ٢٠٠٢ أمكن إنتاج أكثر من ٢٠ مصل مختلف من النباتات المعدلة چينياً كانت موجهة ضد بعض الڤيروسات التي تسبب أمراض للإنسان والتي تم إنتاجها بواسطة بعض ثمار الفاكهة وبعض الخضروات المعدلة چينياً.

ولقد قامت عديد من شركات التقنية الحيوية في كل من المملكة المتحدة وأوروبا بوضع برامج متطورة لإنتاج العقاقير الطبية الحيوية بواسطة النباتات المعدلة چينياً. وفي بعض الحالات تم اختبار مثل هذه العقاقير والأمصال على الإنسان بما فيها مصل السرطان الناتج من نباتات البطاطس المعدلة چينياً وكذلك الإنزيم الذي تم تصميمه لمعالجة الأفراد المصابين بتليف الرئة والمنتج بواسطة نباتات الذرة المعدلة چينياً. كما أمكن إنتاج الأنترفيرون المضاد لنمو وتكاثر الڤيروسات في الخلايا المعدية بالڤيرس بواسطة نبات Duckweed المعدل چينياً بالچين المرغوب وهو نبات بسيط ينمو في المياه. والحواجز التي تقف أمام إنتاج العقاقير الطبية الحيوية من النباتات المعدلة چينياً لا تتضمن فقط كمية الناتج وفعاليته العملية ولكنها تتضمن أيضاً تكاليف إنتاج مثل هذه العقاقير الطبية الحيوية بواسطة النباتات المعدلة چينياً بالچينات المرغوبة كما تتطلب إنتاج العقاقير الطبية الحيوية بواسطة النباتات المعدلة چينياً استخدام مزارع معزولة وآمنة لمنع حدوث تلوث المحاصيل الآخرى من انتقال الچينات المنقولة والمرغوبة من النباتات المعدلة چينياً إلى نباتات المحاصيل الأخرى.

المعالجة النباتية للملوثات والاستخدامات الاخرى للنباتات المعدلة وراثيا

Phytoremediation and Other uses for Trangenic Plants

على الرغم من أن أهم تطبيقات البيوتكنولوجى هو إنتاج أصناف نباتية معدلة چينياً جديدة مقاومة وراثيا لمبيدات الحشائش أو مقاومة وراثياً للآفات الحشرية وكذلك تحمل الظروف البيئية القاسية مثل الإجهاد المائى وارتفاع نسبة الأملاح فى مياه الرى وكذلك إنتاج أصناف نباتية معدلة چينياً جديدة ذات الاحتياج القليل من الأسمدة الكيميائية وذات القيمة الغذائية العالية فقد أمتد استخدام النباتات المعدلة چينياً خارج مجال التطبيق الزراعى والتى من بينها تنظيف البيئة (Phytoremediation) .

وهذا التطبيق يتمثل فى استخدام النباتات المعدلة جينياً لتنظيف البيئة سواء تنظيف المياه أو التربة من الملوثات ولكن هذا التطبيق مازال فى مراحله الأولى ولكنه يخطو خطوات سريعة فى السنين القليلة الماضية . وعموماً يوجد طريقتين لحماية تلوث التربة باستخدام النباتات:

الغطاء النباتى الارضى Photostabilization

وهذه الطريقة ببساطة هى عمل غطاء أرضى من النباتات لحماية الموقع من التلوث حيث يقدم هذا الغطاء الأرضى النباتى حماية جيدة من الرياح وفيضان المياه. وعلى الرغم من أن هذه الحماية بالغطاء النباتى تكون بواسطة النباتات الطبيعية إلا أن استخدام الناتات المعدلة جينياً سوف يؤدى إلى زيادة النظام الجذرى أو تشجيع النباتات لتحمل التلوث.

أستخلاص الملوثات من التربة Photoextraction

وفى هذه الطريقة تقوم النباتات بتجميع الملوثات فى أنسجتها ثم تحصد النباتات بعد ذلك وتعامل بطريقة كما ينبغى. وتحتوى بعض النباتات على نظم طبيعية لتجميع أيونات العناصر الثقيلة بينما البعض الآخر من النباتات تحتاج إلى تحوير لتمتص المواد السامة ومن بين هذه النباتات التى تقوم بتجميع المواد السامة فى أنسجتها بصورة طبيعية نبات Brakefern (Pteris vittata) حيث يستطيع تجميع حوالى ٧٥٠٠ ميكروجرام/جرام من الارسينيك (Arsenic) من الموقع الملوث وبعض النباتات تستطيع تجميع أو تركيز الارسينيك فى أوراقها بمقدار ٢٠٠ مرة قدر التركيز الموجود فى التربة.

ومن الأمثلة الأخرى أنه أمكن تخليق نباتات معدلة جينياً لإزالة الملوثات السامة حيث أمكن إضافة كل من الجين (mer A) والجين (mer B) المأخوذين من البكتيريا إلى جينوم نباتات الأرابيدوبسس (Arabidopsis) ونبات الدخان وأشجار Polar trees ولقد وجد أن البروتينات التى ينتجها هذين الجينين تزيل الزئبق من مركبات الزئبق العضوية وتحويلها إلى عنصر زئبق والذى يتطاير ويهرب فى الهواء.

ودراسة جينومات (Genomes) النباتات التى تقوم بتجميع الزئبق بصورة طبيعية سوف يكون مفيداً جداً فى وصف البروتينات الطبيعية وكذلك الممرات الحيوية التى تسبب التخلص من البروتينات السامة. وهذا الطراز من المعرفة سوف يساعد كثيراً فى تخطيط الأبحاث لإنتاج نباتات معدلة جينياً من أجل تنظيف البيئة (Photoremediation).

المركب السام Bt والفراشات Bt Toxic and Butterflies

نقطة الجدل الأخرى التى تثار حول النباتات المعدلة چينياً هو تأثيرها على الكائنات الأخرى غير الكائنات الهدف بمعنى تعرض النباتات أو الحيوانات بطريقة غير مقصودة إلى المحاصيل المعدلة چينياً. ففى البحث الذى نشر فى مجلة Nature أوضح ان فراشات حشرة Monarch butterflies ماتت بأكلها حبوب لقاح من نباتات الذرة المعدلة چينيياً والتى تحمل الچين Bt. هذه الدراسة أزعجت المؤسسة العلمية وكذلك جماعات حماية البيئة ففى هذه الدراسة قضت يرقات حشرة Monarch الصيف فى أجزاء من كندا وفى الغرب الأوسط تتغذى بصفة خاصة على نباتات حشيشة اللبن (Milkweed plants) وفى النهاية هاجرت الفراشات تامة النمو إلى مناطق خاصة من المكسيك ، وفى الربيع هاجرت أو عادت الفرشات إلى الغرب الأوسط من كندا لوضع البيض ثم تكررت الدروة.

وفى التجربة التاليه قام العلماء بجامعة كورنيل (Cornell University) بطحن أوراق نبات حشيشة اللبن مع حبوب لقاح نبات الذرة المعدل چينياً تحمل الچين Bt وذلك لمقارنتها مع أوراق نبات حشيشة اللبن المطحونة مع حبوب لقاح طبيعية لنبات الذرة وكذلك مع أوراق نباتات حشيشة اللبن بدون حبوب لقاح. ولقد وجد أن اليرقات التى أكلت حبوب لقاح نبات الذرة المعدل چينياً والذى يحتوى على الچين Bt كان نموها بطيئاً وكانت تأكل أقل وماتت بمعدل مرتفع عن باقى المجموعتين الأخرتين.

ولكن هناك كثيراً من الأعتراضات حول هذه الدراسة منها على سبيل المثال أنها لم توضح كمية حبوب اللقاح الموجودة بالفعل على نباتات حشيشة اللبن وأن الباحثين وضعوا كمية من حبوب اللقاح اكبر من تلك المشاهدة فى حقول الذرة. وبالإضافة إلى ذلك أن اليرقات غالباً ما ترفض أكل حبوب اللقاح التى تحتوى على الچين Bt التى تغطى أوراق نبات حشيشة اللبن مما يعضد ذهاب وتحرك هذه اليرقات إلى نباتات حشيشة اللبن الأخرى والموجودة فى البيئة الطبيعية.

ولقد وجد جماعات حماية البيئة أن هذه الدراسة هى علامة توضح ان المحاصيل المعدلة چينياً سوف تسبب ضرراً بالبيئة مثل المبيدات الكيميائية ومع ذلك فإن أفضل نتيجة لهذا الاعتراض هى توجيه البحث والدراسة على النباتات المعدلة چينياً والتى تحمل الچين Bt وتاثيرها على الفراشات والكائنات الأخرى غير الهدف .

ولقد تم تقدير كمية حبوب اللقاح فى حقول الذرة وكذلك الموجودة على أوراق نباتات حشيشة اللبن والمحيطة بحقول الذرة. ووجد أن يرقات حشرة (Monarch) تتأثر بوجود حبوب بمقدار ١٠٠ حبة لقاح لكل سم٢ والتى تحتوى على الچين Bt وهذا المستوى من حبوب اللقاح يتواجد فقط فى نباتات حشيشة اللبن المباشرة والمحيطة بحقول الذرة أوتلك الموجودة داخل حقول الذرة وأن هذا المستوى لا يوجد أبداً فى المناطق المجاورة المفتوحة حيث وجد أنه على بعد مسافة ٢ متر من حافة حقول الذرة يصل تركيز حبوب اللقاح إلى ١٤ حبة لقاح لكل سم٢ . وفى البيئة الطبيعية لا تتغذى يرقات حشرة الـــ Monarch على هذه الأوراق المغطاة بحبوب اللقاح ولكنها تتحرك إلى جزء آخر من النبات وبالإضافة إلى ذلك فإن سقوط الأمطار أو وجود الرياح أثناء تكوين حبوب اللقاح سوف يؤثر كثيراً على هذا العدد من حبوب اللقاح. فسقوط المطر لمرة واحده سوف يزيل نصف كمية حبوب اللقاح الموجودة على النبات. والأكثر من ذلك فإن فراشات حشرة الـــ Monarch تضع بيضها على أوراق نبات حشيشة اللبن التى لا تحتوى على حبوب اللقاح وهذا يقلل أيضاً من المخاطر الضارة.

ولقد أجريت دراسات أخرى لتحديد أى طراز من المركب السام (Bt toxin) التى تؤثر على يرقات حشرة الـــ Monarch أوضحت الدراسات أن هناك طراز واحد من هذه المركبات السامة يكون له تأثير ضار حقيقى بينما الطرز الأخرى كانت غير ضارة ومع ذلك فإن هذه الدراسة أجريت فى المعمل ولم تكن هناك فرصة لليرقات فى الاختيار للتغذى على أوراق نباتات حشيشة اللبن لا تحتوى على حبوب لقاح.

الباب التاسع

الحيوانات المعدلة چينياً

Transgenic Animals (T.G.A.)

قام الإنسان منذ آلاف السنين بتحسين المحاصيل النباتية والحيوانات المستأنسة عن طريق التربية بالإنتخاب. ومن الواضح أنه كلما زادت معلوماتنا الوراثية كلما كانت محاولات تحسين المحاصيل النباتية والماشية أسرع وأكثر تأثيراً. وفى الوقت الحاضر يمكن تحوير التركيب الچينى (Genotype) للنباتات والحيوانات عن طريق هندسة الچينات أو الهندسة الوراثية. ومعظم التجارب الأولية كانت تجرى على الفئران (Mice) لإنتاج حيوانات معدلة چينياً (T.G.A.) وأن معظم الحيوانات الكبيرة والمستأنسة لم يتم هندستها چينياً بما فيها الماشية والأغنام وكذلك الحيوانات الصغيرة مثل الكلاب والقطط.

وفى الحيوانات المعدلة چينياً تحمل كل خلية من خلايا الحيوان الچينات الجديدة فى النسيج التناسلى (Germline) وليس فى الخلايا الجسمية (Somatic cells) كما فى حالة العلاج الچينى (Gene therapy) وبذلك سوف تورث هذه الچينات الجديدة إلى النسل فى الحيوانات المعدلة چينياً. وعموماً فإن مصدر هذه الچينات الجديدة التى يتم نقلها يكون مصدرها من كائنات أخرى وتعرف بالچينات المنقولة (T.G.) والتى قد تكون من كائنات نفس النوع أو من أنواع حيوانية أخرى ليس بينها صلة قرابة تماماً أو يكون مصدرها من النباتات أو الفطريات أو البكتيريا. ويجب هندسة الچينات المنقولة قبل إدخالها فى خلايا الحيوان العائل بحيث تحتوى على بروموتور قوى يسمح للچين المنقول بالتعبير الچينى له تحت ظروف معينة.

تخليق الحيوانات المعدلة چينياً Creation Transgenic Animals

بمجرد أن يصبح الچين المنقول متاحاً تستخدم طريقة الحقن النووى الدقيق (Nuclear microinjection) لتخليق الحيوان المعدل چينياً (T.G.A.) باتباع الخطوات التالية (شكل ٧٧):

١- حقن الچين المنقول (T.G.) فى خلية البيضة بعد الاخصاب مباشرة حيث تحتوى خلية البيضة (Egg cell) على كل من نواة البيضة الأحادية ونواة الحيوان المنوى الأحادية غير مندمجتين معاً وتعرف كل منهما فى هذا الوقت باسم النواة الأولية (Pro-nucleus) ويجب حقن الچين المنقول مباشرة فى نواة الحيوان المنوى الموجود بخلية البيضة وقبل إندماج النواتين معاً (شكل ٧٧). ويحتاج هذا الحقن الدقيق إلى أدوات خاصة ومهارة عالية. ويتراوح معدل نجاح هذه الطريقة ما بين ٥% إلى ٤٠% من المحاولات التى تجرى باختلاف المعامل البحثية.

٢- تحفظ خلية البيضة المعدلة چينياً على بيئة غذائية تسمح بحدوث الانقسامات الخلوية لتكوين الجنين والذى ينقل بعد ذلك إلى رحم الأم الحاضنة (Foster mother) وبداخل رحمها ينمو الجنين المعدل چينياً ويستمر فى النمو داخل رحم الأم الحاضنة حتى يولد الحيوان الجديد والمعدل چينياً (T.G.A.).

٣- بعض هذه الحيوانات المولودة الصغيرة والمعدلة چينياً سوف تحتوى على الچين المنقول بصورة ثابتة لإندماجه بأحد الركوموسومات وبعض الحيوانات الأخرى تفشل فى الحصول على الچين المنقول بسبب فقده. وتسمى الحيوانات التى حصلت على الچين المنقول بصورة ثابتة باسم الحيوانات المؤسسة (Founder animals, F.A.).

٤- يجرى التزاوج بين ذكر وانثى من هذه الحيوانات المؤسسة (F.A.) لتكوين سلالة حيوانية جديدة تحمل نسختين من الچين المنقول (T.G.). ويجب ملاحظة أن الحيوانات المنشأة يحتوى كل حيوان منها على نسخة واحدة من الچين المنقول مندمجاً بأحد الكروموسومات وبالتالى فإنها تعتبر خليطة (Heterozygous) بالنسبة للچين المنقول وعلى ذلك سوف يكون ٢٥% من النسل الناتج من هذا

التزاوج يحتوى على نسختين من الچين المنقول وبذلك تعتبر حيوانات نقية (Homozygous) بالنسبة للچين المنقول بينما يحتوى ٥٠% من النسل على نسخة واحدة من الچين المنقول وبذلك تعتبر حيوانات خليطة (Heterozygous) بالنسبة للچين المنقول وكذلك لا يحتوى ٢٥% من النسل على الچين المنقول.

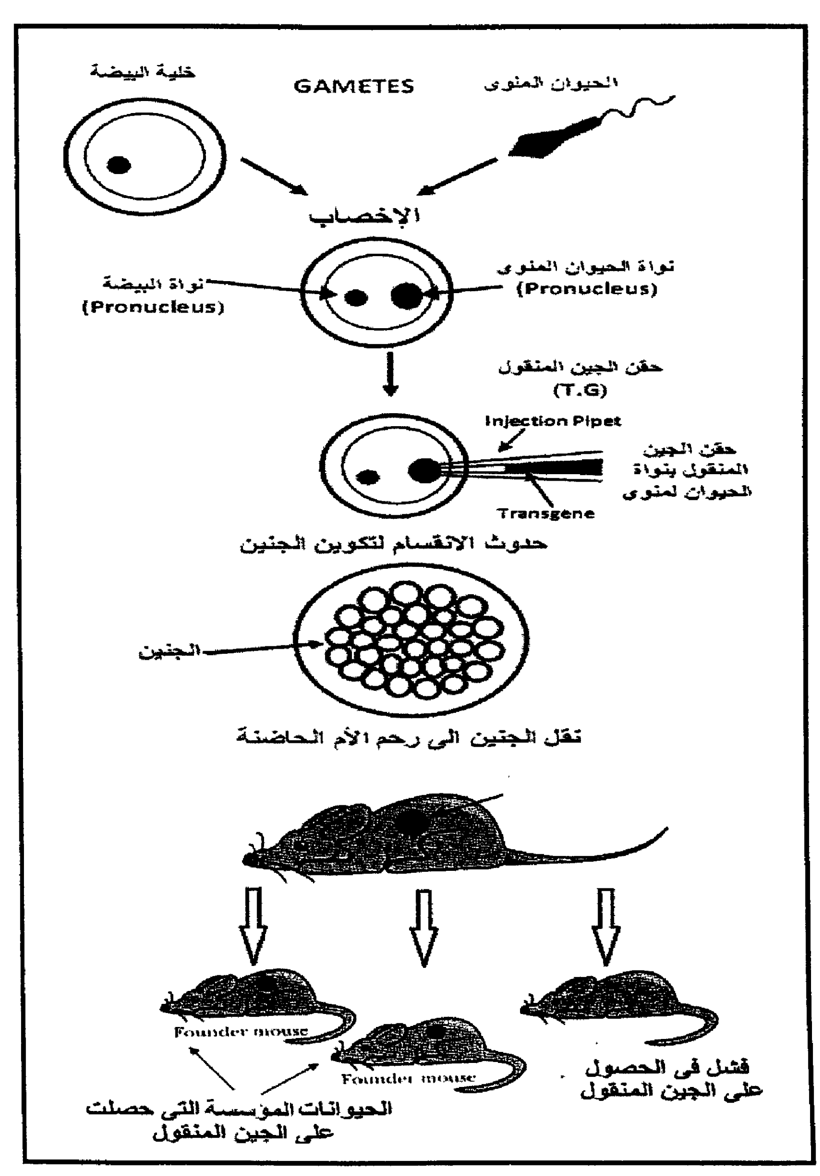
وتعتبر الحيوانات المعدلة چينياً والنقية للچين المنقول أكثر فائدة لإنه إذا أجرى التزاوج بينها تنتج نسلاً جميع أفراده تحتوى على نسختين فقط من الچين المنقول (T.G.). ومع ذلك توجد بعض الاختلافات الناشئة عن الوقت الذى يحدث فيه ادماج الچين المنقول فى نواة الحيوان المنوى الموجودة فى خلية البيضة وهذه الاختلافات على النحو التالى:

١. فى بعض الحالات يحدث ادماج للچين المنقول (T.G.) فى نواة الحيوان المنوى قبل ادماج النواتين المذكرة والمؤنثة معاً مما يترتب عليه أن تحتوى جميع خلايا الجنين على الچين المنقول.

٢. فى بعض الحالات الأخرى يحدث ادماج للچين المنقول (T.G.) بعد إندماج النواتين معاً وحدوث عديد من الأنقسامات الخلوية للجنين وبذلك سوف تحتوى بعض خلايا الجنين على الچين المنقول بينما لا يحتوى عليه البعض الآخر من الخلايا.

٣. فى بعض الحالات الأخرى قد يحدث إدماج لعديد من نسخ الچين المنقول فى نفس النواة بصورة متكررة ومثل هذه الحالات لا تكون ثابتة وغالباً ما يحدث إزالة لهذه النسخ الإضافية من الچين المنقول فى الأجيال التالية.

وعموماً يحدث إدخال الچين المنقول (T.G.) فى كروموسومات خلية البيضة (Egg cell) العائلة بطريقة عشوائية وغالباً ما يحدث ذلك عند المناطق من الكروموسومات التى يحدث عندها كسور فى الركوموسومات بطريقة تلقائية.



شكل (٧٧): يوضح خطوات تخليق حيوان معدل جينياً بواسطة الحقن النووى الدقيق(Nuclear Microinjection)

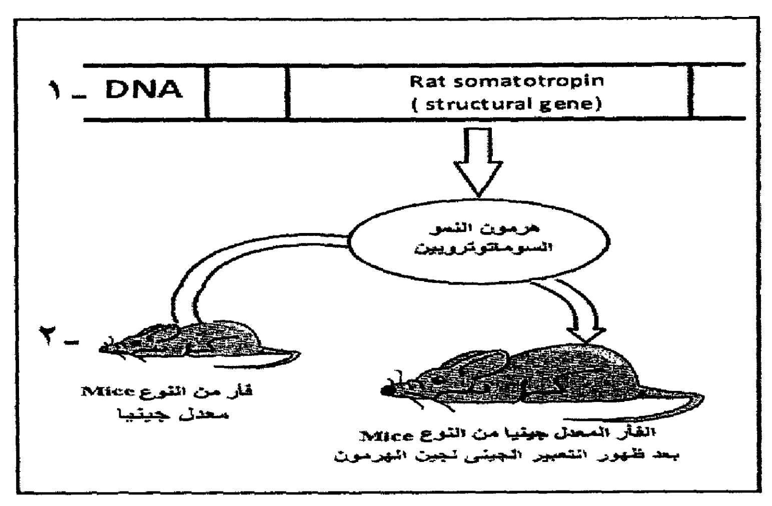
الفئران المعدلة چينياً Transgenic Mice

يوجد نوعين مختلفين من الفئران أحدهما النوع (Mice) وهو نوع صغير الحجم بينما النوع الآخر هو النوع (Rat) وهو نوع كبير الحجم. ولقد استخدمت تكنولوچيا نقل الچين فى تخليق فئران كبيرة الحجم من النوع Mice عن طريق نقل الچين الذى ينتج هرمون النمو السوماتوتروبين (Somatotropin) من نوع الفئران (Rat) وإدماجه فى چينوم الفئران الصغيرة الحجم من النوع (Mice) باستخدام طريقة الحقن النووى الدقيق لخلايا البويضات المخصبة وهذا الهرمون يتركب من سلسلة مفردة عديدة الببتيد ينتجها چين مفرد. وفى عام ١٩٨٥ تم كلونة هذا الچين (Gene cloning) وإنتاج فئران كبيرة الحجم من النوع Mice على النحو التالى (شكل ٧٨):

١- عزل الچين الذى ينتج هرمون السوماتوتروبين من الفئران من النوع Rat .

٢- حقن هذا الچين المنقول (T.G.) فى بويضات مخصبة للفئران من النوع Mice.

٣- نقل هذه البويضات المخصبة إلى أمهات حاضنة من النوع (Mice) لإنتاج أجنة ونسل معدل چينياً من الفئران من النوع (Mice). ولقد وجد أن النسل الناتج والمعدل چينياً كان أكبر حجماً بمقدار مرتين عن الفئران من النوع (Mice) الموجودة بالطبيعة على الرغم من أنها لم تصل إلى حجم الفئران الكبيرة من النوع (Rat). ولقد كانت هذه الفئران المعدلة چينياً تمثل أول حالة لإستخدام تكنولوچيا نقل الچين من حيوان لأخر. ولقد أُجريت محاولات أخرى ناجحة لإدماج هرمون النمو الإنسانى وهو هرمون السوماتوتروبين فى الفئران من النوع Mice وكانت الفئران الناتجة والمعدلة چينياً أكبر حجماً من الفئران الطبيعية.



شكل (٧٨): يوضح إنتاج فأر كبير الحجم معدل چينياً من النوع Mice

١- قطعة الـ DNA التى تحتوى على الچين الذى ينتج هرمون السوماترتروبين المأخوذ من الفأر كبير الحجم من النوع Rat

٢- إنتاج فأر صغير الحجم من النوع Mice وظهور التعبير الچينى للچين الذى ينتج هرمون السوماتوتروبين والذى أدى إلى إنتاج فأر كبير الحجم من النوع Mice.

إنتاج بعض البروتينات بواسطة الأبقار المعدلة چينياً

Production of some protein using transgenic cows

استخدمت تكنولوچيا الچين المنقول فى كلونة (Cloning) البكتيريا بچين إنتاج هرمون السوماتوتروبين المعزول من الأبقار بطريقة تسمح بظهور التعبير الچينى له فى البكتيريا مما يسمح بإنتاج كميات كبيرة من هذا الهرمون ويعرف هذا الهرمون الآن باسم (rBST) Recombinant Biovine Somatotropin والذى يستخدم فى صناعة الالبان لزيادة إنتاج اللبن فعند حقن الأبقار بكميات إضافية من هذا الهرمون أدى ذلك إلى زيادة إنتاج اللبن بدلاً من الحصول على أبقار عملاقة (Giant cows) كما هو الحال فى حالة الفئران المعدلة چينياً. ويباع حالياً اللبن المنتج من الأبقار المعاملة بهذا الهرمون على نطاق تجارى.

كذلك استخدمت تكنولوچيا الچين المنقول (T.G.) فى البكتيريا *E. coli* واستخدامها كمصانع بيولوجية لإنتاج بعض هرمونات الإنسان الهامة مثل الأنسواين والسوماتروبين والسوماتوستاتين ولكن تكلفة إنتاج مثل هذه الهرمونات بواسطة البكتيريا المعدلة چينياً مرتفعة كما تحتاج إلى مهارة كبيرة لذلك أتجه العلماء لإستخدام الماشية المعدلة چينياً لإنتاج مثل هذه الهرمونات لتقليل تكلفة إنتاج هذه الهرمونات ومع ذلك تظل تكلفة إنتاجها مرتفعة.

ونظراً لأن الأبقار المنتجه للألبان تنتج كميات كبيرة من اللبن سنوياً فضلاً عن تواجد الصناعة المتعلقة بإنتاج اللبن وتجميعه لذلك استخدمت هذه الميزه لإنتاج بعض البروتينات والهرمونات الهامة بواسطة الأبقار المعدلة چينياً وكذلك أستخدام حيوانات المزرعة الأخرى. ولتحقيق هذا الهدف فإنه يجب وضع الچينات المكلونة تحت تحكم چين منظم يسمح بظهور التعبير الچينى للچين المنقول فى الغدد الثديية فقط وبذلك سوف ينتج ناتج الچين المنقول أثناء إنتاج اللبن وعلى ذلك فإنه تجرى حالياً فى المعامل البحثية المحاولات لإنتاج أبقار معدلة چينياً لإنتاج بعض الهرمونات والبروتينات الهامة بطريقة اقتصادية.

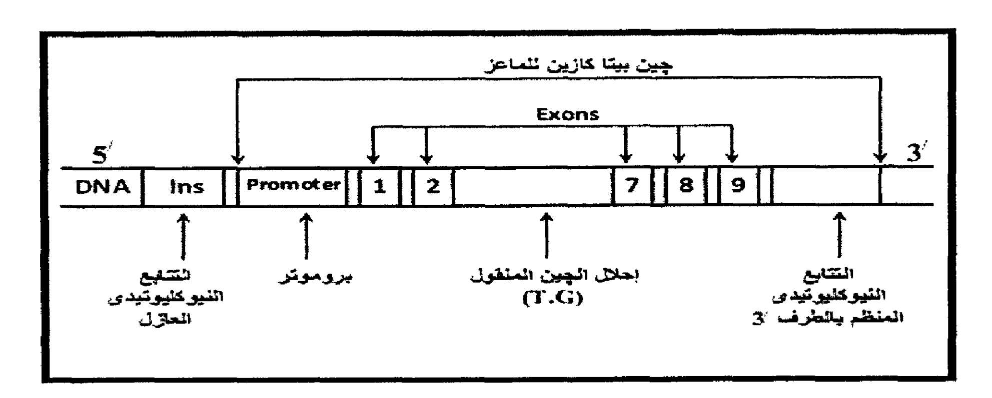
الماعز المعدلة چينياً **Transgenic goats**

استخدمت أيضاً تكنولوچيا نقل الچين فى الماعز لإنتاج ماعز معدلة چينياً تقوم بإنتاج بعض المركبات الكيميائية الهامة ذات الأغراض الطبية والتى تستخدم فى إذابة جلطات الدم ولإنتاج ماعز معدلة چينياً تحتوى على الچين المنقول الذى يجب أن يظهر تعبيره أثناء إفراز اللبن كان باتباع الخطوات التالية (شكل ٧٩)

١- إحلال الچين المنقول (T.G.) محل جزء من چين بيتا كازيين (β-casein) بحيث يحل محل الاكزونات الثالث والرابع والخامس والسادس وما بينهما من أنترونات من هذا الچين الذى يحتوى على تسعة اكزونات.

٢- يضاف للچين المنقول بروموتور (Promoter) چين بيتا كازيين (β-casein) والذى ينظم تعبير الچين المنقول بحيث يتم تعبيره فى الغدد الثديية فقط أثناء إفراز اللبن ويضاف هذا البروموتور إلى الطرف $5'$ من الچين المنقول (T.G.).

٣-يضاف كذلك للچين المنقول وبجوار البرموتور التتابع النيوكليوتيدى العازل (Insulator) ويعمل هذا العازل على غلق تأثير االعناصر المنظمة الأخرى على التعبير الچينى للچين المنقول والموجودة بالطرف $3'$ من الچين المنقول.



شكل (٧٩): يوضح الچين المنقول الذى اندمج فى چينوم DNA الماعز لإنتاج ماعز معدلة چينياً وذلك باحلال الچين المنقول بدلاً من الاكزونات الثالث والرابع والخامس والسادس والانترونات الثالث والرابع والخامس والسادس لچين بيتاكازين للماعز بالإضافة إلى بروموتور العائل والتتابع النيوكليوتيدى العازل (Insulator) والذى يغلق أى عناصر منظمة أخرى من تأثيرها على الچين المنقول بالطرف $3'$.

الطرق البديلة لإنتاج حيوانات معدلة چينياً

Alternative approaches for production of transgenic animals

على الرغم من أن طريقة الحقن النووى الدقيق (Nuclear microinjection) للچين المنقول بالنواة مباشرة كانت أول طريقة استخدمت للحصول على حيوانات معدلة چينياً والتى مازالت تستخدم على نطاق واسع إلا أنه يوجد عديد من الطرق الأخرى البديلة التى تستخدم فى نقل الچين وهى:

١) إستخدام الڤيروسات من الطراز رتروڤيروسات (Retroviruses) لحمل ونقل الچين وإدماجه فى كروموسومات الخلايا الحيوانية العائله. هذا الطراز من الرتروڤيروسات يمكنها مهاجمة الأجنة

المبكرة بما فيها الخلايا الجذعية (Stem cells) الجنينية وهذا الطراز من الڤيروسات لا يحتاج إلى مهارة فى حقنها للخلايا الحيوانية العائله حيث يحقن هذا الطراز من الڤيروسات والتى تحمل الچين المنقول فى البويضات المخصبة ثم بعد ذلك تنقل البويضات المخصبة إلى رحم الأمهات الحاضنات للحصول على أجنة حيوانية معدلة چينياً وتستكمل خطوات الحصول على حيوانات معدلة كما سبق ذكره فى طريقة الحقن النووى الدقيق. ومن عيوب هذه الطريقة أن هذا الطراز من الڤيروسات يحمل كمية محددة من الـــ DNA فضلاً عن أن الحيوانات المؤسسة (Founder animals) بواسطة هذه الطريقة دائماً ما تكون كيميرا (Chimaras) ويرجع ذلك إلى دخول الڤيرس وما يحمله من الچين المنقول فى بعض خلايا الجنين بعد حدوث إندماج النواتين المذكره والمؤنثة معاً. وعلى ذلك فإنه نادراً ما تستخدم الرتروڤيروسات فى محاولات تخليق حيوانات معدلة چينياً كاملة. ومع ذلك تستخدم الحيوانات المعدلة چينياً بصورة جزئية فى دراسة مقارنة الأنسجة المعدلة چينياً بالأنسجة الطبيعية فى نفس الحيوان الذى يحتوى بعض اجزاؤه على الچين المنقول

٢) طريقة استخدام الخلايا الجذعية الجنينية (Embryonic stem cells) وفى هذه الطريقة تستخدم خلاا الجذع الجنينية لإنتاج حيوانت معدلة چينياً (.T.G.A). والخلايا الجذعية الجنينية هى خلايا بادئة لتكوين أنسجة معينة من الجسم. وتؤخذ الخلايا الجذعية الجنينية من الجنين فى مرحلة مبكرة جداً وهى مرحلة البلاستوسيت (Blastocyte) حيث تحتفظ هذه الخلايا بمقدرتها على النمو إلى أى نسيج جسمى مشتملاً ذلك على النسيج التناسلى (Germline) ويمكن زراعة خلايا الجذع الچينينة فى مزارع لزراعة الخلايا وإدخال الــDNA أو الچين المنقول (.T.G) لأى جزء من الخلايا النامية فى المزرعة الخلوية. ولنجاح عملية تخليق الحيوانات المعدلة چينياً يجب المحافظة على خلايا الجذع الجنينية تحت ظروف تمنع تشكلها (Differentiated). وبعد ذلك يتم إدخال خلايا الجذع الجنينية المهندسة چينياً فى الفجوة المركزية للجنين المبكر فى مرحلة البلاستوسيت (شكل ٨٠). ويترتب على ذلك تخليق جنين مختلط (Mixed embryo) والذى ينتج عنه حيوان يحتوى على كيميرا وراثية (Genetic chimera) يتركب من بعض الانسجة المعدلة چينياً والبعض الأخر أنسجة طبيعية وإذا كان الجنين العائل (Host embryo) وخلايا الجذع الچينينة

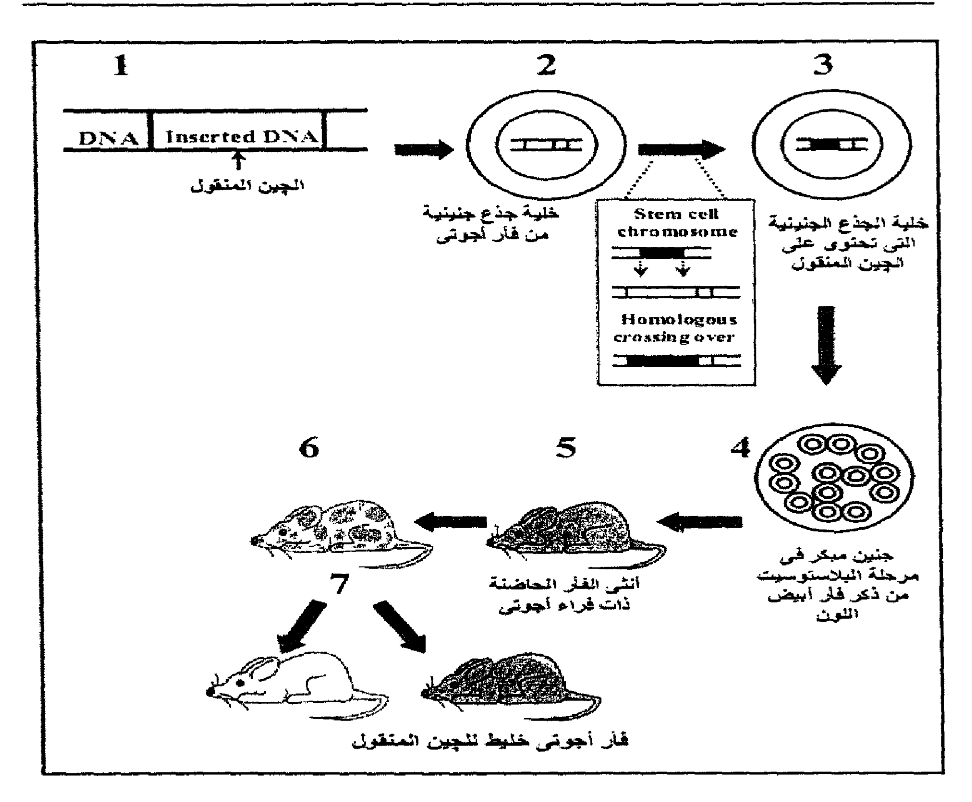
من سلالات مختلفة وراثياً ذات لون فراء مختلف فسوف يتكون حيوان ذو فراء مبقع وهذا يسمح بتحديد المقاطع من الحيوان المعدلة جينياً بكل سهولة. وهذه الحيوانات المؤسسة (Founder) ذات الكيميرا الوراثية يجب أن يحدث تزاوج بينها وبين حيوانات برية (Wild-type) فإذا حدث إدماج للجين المنقول فى الخلايا الجذعية الجنينية التى سوف تعطى النسيج التناسلى (Germline) فإن صفات لون الفراء فى هذه الخلايا سوف تورث إلى النسل. وفى الفئران يستخدم غالباً لون الفراء الأبيض (صفة متنحية) ولون الفراء الاجوتى (اللون البنى) وهى الصفة السائدة للكشف عن الجين المنقول. وعادة ما تؤخذ خلايا الجذع الجينينة من السلالة اجوتى (Agouti). ونظراً لأن لون الفراء الاجوتى هو الصفة السائدة يجعل من السهل اكتشاف وتعقب الخلايا التى عدلت جينياً.

تأثير الموقع على التعبير الجينى للجين المنقول

Location effect on expression of the transgene

غالباً ما يختلف التعبير الجينى للجين المنقول (T.G.) فى الحيوانات والنباتات المعدلة جينياً والتى تحتوى على نفس الجين المنقول إختلافاً كبيراً. كذلك يختلف مستوى التعبير الجينى للجين المنقول فى الأنسجة المختلفة لنفس الكائن سواء نبات أو حيوان. وترجع هذه الإختلافات فى مستوى التعبير الجينى للجين المنقول إلى:

١- موقع الجين المنقول بالكروموسوم (DNA). فاذا حدث إدماج له فى منطقة هتروكروماتين (Heterochromatin) يحدث له تعبير جينى ضعيف أو لا يحدث له تعبير جينى تماماً وذلك لأن هذه المناطق من الكروموسومات يكون الـــDNA بها شديد الإلتفاف وغالباً ما تضاف مجاميع الميثايل إلى بعض النيوكليوتيدات فى هذه المناطق كما أنها تكون مغطاة بالبروتينات الهستونية (Histones) ومن ثم فإنه عادة لا يحدث نسخ لمثل هذه المناطق من الكروموسومات (شكل ٨١).



شكل (٨٠): خطوات إنتاج حيوانات معدلة چينياً (.T.G.A) باستخدام خلايا الجذع الجنينية:

١-تكوين الـــDNA المهندس چينياً بالچين المراد إدخاله (Inserted DNA) .

٢-الحقن الدقيق للـــDNA بداخل خلايا الجذع الجنينية من فأر أجوتى (بنى اللون) .

٣- السماح بحدوث العبور المتماثل (Homologous crossing over) بين الچين المنقول وأحد كروموسومات خلية الجذع الجنينية.

٤-ادخال خلايا الجذع الجنينية السابقة فى خلايا جنين مبكر فى مرحلة البلاستوسيت لذكر فأر ذو فراء أبيض.

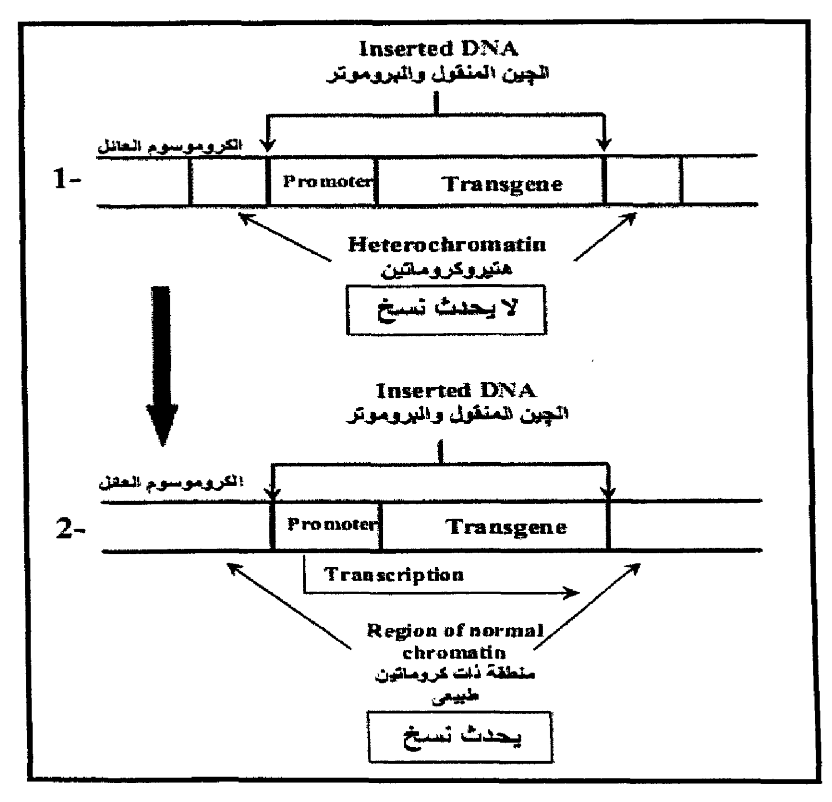
٥-اعادة زراعة الجنين السابق فى أنثى فأر ذات حمل كاذب ذات فراء أجوتى.

٦-وجود نسل ذكر ذو كيميرا وراثية وهو ذكر أبيض ذو بقع بنية اللون (بنى اللون).

٧-تلقيح الذكر السابق بأنثى ذات فراء ابيض وسوف يحتوى النسل الناتج على فأر أجوتى اللون خليط للچين المنقول (Heterozygous) فى الخلايا التناسلية.

٢- موقع الچين المنقول (T.G.) بالنسبة للچينات الأخرى أو التتابعات النيوكليوتيدية التى تعزز التعبير الچينى والتى تتواجد على مسافات متباعدة فى الـــDNA وبالتالى فإنها تؤثر على التعبير الچينى للچين المنقول تبعاً لقرب أو بعد الچين المنقول عن هذه المعززات (Enhancers).

ولقد تأكد هذا التأثير الموضعى باستخلاص الچين المنقول كاملاً من الحيوانات المعدلة چينياً (T.G.A.) والتى لا يحدث فيها التعبير الچينى للچين المنقول وإدخاله وإدماجه فى حيوان آخر والذى يظهر به التعبير الچينى مما يدل على أن الچين المنقول كان سليماً وكاملاً وأن الفشل فى ظهور تعبيره فى الحيوان الأول المعدل چينياً يرجع إلى موقع الچين المنقول فى چينوم (DNA) الحيوان العائل أو الحامل للچين المنقول (T.G.).



شكل (٨١): يوضح تأثير الموقع على التعبير الچينى للچين المنقول

شرح شكل (٨١):

١. إدماج الچين المنقول Transgene بالإضافة إلى البروموتور فى منطقة هتيروكروماتين (Heterochromatin) بالكرروموسوم العائل حيث لا يحدث التعبير الچينى للچين المنقول.

٢. ادماج نفس الچين المنقول بالإضافة إلى البروموتور فى منطقة تحتوى على كروماتين طبيعى (Normal chromatin) حيث يحدث التعبير الچينى للچين المنقول.

التحكم المتعمد فى التعبير الچينى للچين المنقول

Deliberate control of transgene expression

توجد عديد من الحالات التى يكون من المفيد والمفضل ضرورة التحكم فى التعبير الچينى للچين المنقول (T.G.). فالإنتاج الصناعى لبروتين ما يكون من المرغوب حدوث أعلى مستوى من التعبير الچينى للچين الذى ينتج هذا البروتين ولكن ذلك ليس حقيقى دائماً وذلك لأن بعض البروتينات يكون لها تأير سام عند تواجدها بكميات كبيرة وبالتالى يجب تنظيم عمل هذه الچينات المنقولة عند تخليق هذه الحيوانات المعدلة چينياً لكى تنتج هذه البروتينات بمعدل منخفض. وعندما يكون الهدف من الچين المنقول هو أستخدامه فى التحليل الوظيفى فإنه يجب وضعه تحت نظام من التحكم يجعله يعمل (Switch on) أو يتوقف (Swich off) عن العمل . ويعتبر مثل هذا التنظيم فى غاية الأهمية بالنسبة للچينات المنقوله التى يجب أن يظهر تعبيرها الچينى فقط فى بعض الخلايا الخاصة أو عند مراحل معينة من النمو. ويوجد عديد من النظم المتاحة التى تساعد فى التحكم وتنظيم التعبير الچينى للچينات المنقولة منها ما يلى:

أولا: بروموتور العائل التحفيزى Inducible endogenous promoter

فى الدراسات الأولية التى أجريت لإنتاج حيوانات معدلة چينياً كان يضاف للچين المنقول بروموتور من الحيوان العائل والذى يعرف ببروموتور العائل (Endogenous promoter) والذى يستجيب لمنبهات معينة. فعلى سبيل المثال وضع الچين الذى ينتج هرمون النمو السوماتوتروبين والمأخوذ من الفئران كبيرة الحجم (Rat) فى أحد كروموسومات الفئران صغيرة الحجم من النوع (Mice) وهو الحيوان العائل تحت تحكم بروموتور الچين الذى ينتج بروتين ميتالوثيونين

(Metallothionine) للفئران الصغيرة من النوع Mice (الحيوان العائل) وهذا البروموتور يتم تحفيزه بواسطة العناصر الثقيلة مثل الرصاص والكادميوم والزنك . ومع ذلك يوجد بعض المشاكل المتعلقة بالتأثير السام لهذه العناصر الثقيلة وخاصة إذا كان التحفيز لفترة طويلة.

كذلك فإن بروموتور الصدمه الحرارية (Heat shock promoter) الخاص بالچين (Hsp70) فى الدروسوفيلا يعتبر مثال آخر على البروموتور الطبيعى والذى يستخدم فى تنظيم التعبير الچينى للچين المنقول (T.G.) . وهذا البروموتور يكون غير نشط تحت درجة حرارة الغرفة وبزيادة درجة الحرارة إلى ٣٧ °م يحدث تحفيز له ومع ذلك توجد بعض العوائق المتعلقة من استخدام هذا الطراز من البروموتور التحفيزى وهى:

١- غالباً ما يحدث تعبير للچين المنقول بمستويات معنوية حتى فى غياب المحفز(Inducer) وأنه غالباً ما يكون التحفيز للچين المنقول بمقدار عشرة أضعاف التحفيز الطبيعى .

٢- غالباً توجد تأثيرات جانبية سامة والتى ترجع مباشرة إلى المحفز (مثل الزنك أو درجة الحرارة المرتفعة) أو أنها ترجع إلى تحفيز چينات أخرى طبيعية تستجيب لنفس المحفز.

٣- ربما ينفذ المحفز ببطىء إلى بعض الأنسجة أو ينفذ فقط إلى بعض أنسجة الكائن. ويمكن التغلب على بعض هذه العقبات باستخدام بروموتورات يتم بنائها صناعياً أو بروموتور معاد توليفه.

ثانياً: نظم البروموتور المعاد توليفه Recombinant promoter systems

تستخدم الچينات البكتيرية المنظمة للتعبير الچينى للچينات البكتيرية لتنظيم التعبر الچينى للچين المنقول فى الحيوانات والنباتات المعدلة چينياً ومن هذه الچينات المستخدمة ما يلى:

١) الچين الكابت (Repressor gene) لاوبرون اللاكتوز وهو الچين Lac I والذى ينتج البروتين الكابت (Repressor protein) الذى ينظم التعبير الچينى لچينات اوبرون اللاكتوز فى البكتيريا *E. coli*.

٢) الچين الكابت لاوبرون المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين وهو الچين Tet R الذى ينتج البروتين الكابت (Tet R repressor).

ولاستخدام الچين الكابت lac I فى تنظيم التعبير الچينى للچين المنقول فى الحيوانات المعدلة چينياً يصمم الــDNA المعاد توليفه بحيث يحتوى على ما يلى (شكل ٨٢):

١- الچين المنقول (T.G.).

٢- الچين الكابت I لاوبرون اللاكتوز والذى ينتج البروتين الكابت.

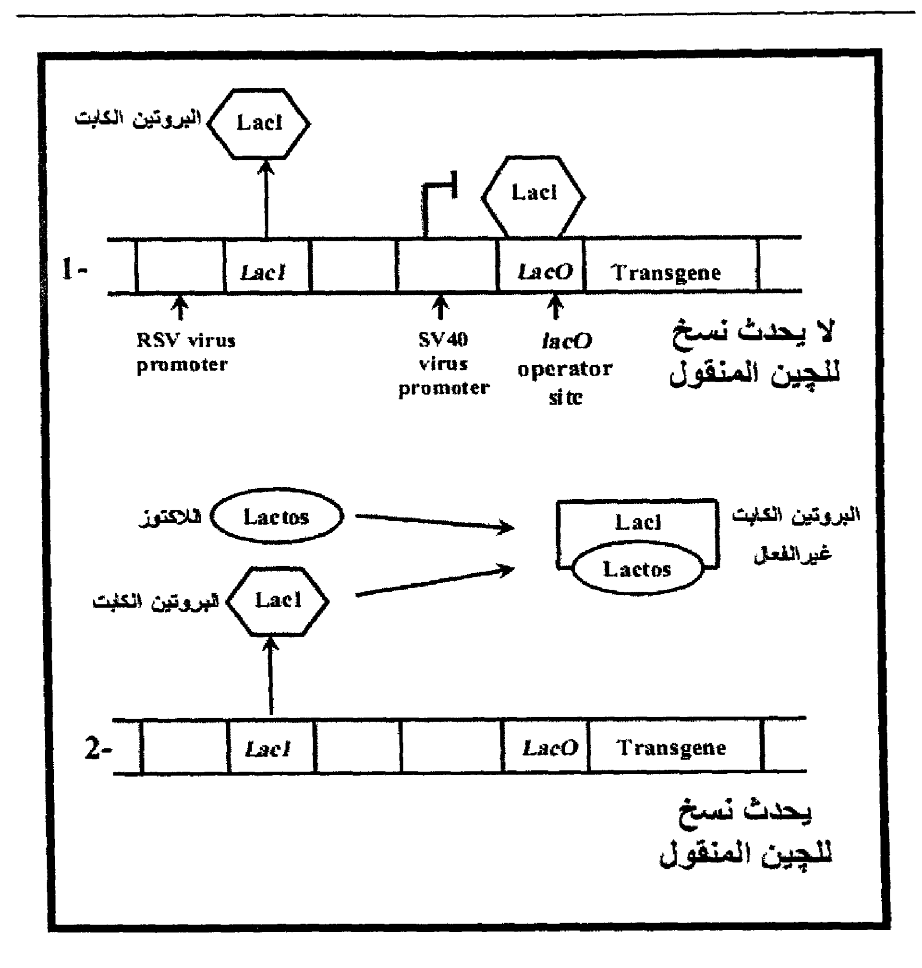
٣- أوبريتور (O) operator اوبرون اللاكتوز.

٤- بروموتور مأخوذ من الڤيرس Rousa sarcoma virus (RSV) لضمان التعبير الچينى للچين المنقول فى الخلايا الحيوانية.

٥- بروموتور من الڤيرس SV40 (Simian virus 40) للتحكم فى التعبر الچينى للچين المنقول والذى يضاف إلى اوبريتور (Operater) اوبرون اللاكتوز. ويتم تنظيم التعبير الچينى للچين المنقول على النحو التالى:

١- فى غياب المحفز (Inducer) (سكر اللاكتوز) يقوم الچين الكابت I (Lac I) بإنتاج البروتين الكابت (Lac I repressor) والذى يرتبط بموقع الاوبريتور وبالتالى يتوقف التعبير الچينى للچين المنقول (شكل ٨٢).

٢- فى وجود المحفز فإنه يرتبط بالبروتين الكابت والموجود بموقع الاوبريتور (O) وبذلك يتحرر الاوبريتور من هذا البروتين الكابت وبذلك يصبح الاوبرون فعال وظيفياً ويحدث التعبير الچينى للچين المنقول.



شكل (٨٢): يوضح تنظيم التعبير الچينى للچين المنقول (T.G.) باستخدام الچينات المنظمة لاوبرون اللاكتوز (Lac operon) على النحو التالى:

١. فى غياب المحفز يدفع البروموتور RSV promoter الچين الكابت lac I لإنتاج البروتين الكابت الذى يرتبط بموقع الاوبريتور (Lac O) وبذلك يصبح الاوبرون متوقف أو غير فعال وظيفياً ولا يحدث تعبير چينى للچين المنقول Transgene (T.G.) .

٢. فى وجود المحفز اللاكتوز والذى يرتبط بالبروتين الكابت الذى ينتجه الچين الكابت lac I وبذلك لا يستطيع الارتباط بموقع الاوبريتور (Lac O) وبذلك يصبح الاوبرون فعال وظيفياً ويحدث التعبير الچينى للچين المنقول .

كذلك يستخدم اوبرون المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين (Tet operon) فى تنظيم التعبير الچينى للچين المنقول فى الحيوانات المعدلة چينياً ويتم هذا بإدماج الچين المنقول فى هذا الاوبرون (Tet operon) والذى يحتوى على الچين الكابت (Tet R) والذى ينتج البروتين الكابت (Repressor) وينظم تعبير الچين المنقول بارتباط البروتين الكابت بموقع الاوبريتور (O) وذلك فى غياب المحفز (التتراسيكلين) يصبح الاوبرون غير فعال وظيفياً ويتوقف تعبير الچين المنقول بينما عند إضافة المحفز (التتراسيكلين) يقوم بتحرير الاوبريتور من البروتين الكابت وبذلك يصبح الاوبرون (Tet operon) نشط وظيفياً ويحدث التعبير الچينى للچين المنقول.

ويعمل كلاً من النظامين السابقين جيداً فى الكائنات حقيقية النواة حيث ينتج كلاً النظامين تعبير عالى للچين المنقول تحت النظام التحفيزى خاصة النظام الثانى والذى ينتج ٥٠٠ ضعف من ناتج الچين المنقول ولكن من أحد مشاكل هذين النظاميين هى الحاجة إلى معدل ثابت من التعبير الچينى لكلا الچينين الكابتين (Tet R gene) , (Lac I gene) واللذان ينتجان البروتينات الكابتة التى ترتبط بموقع الاوبريتور لتنظيم التعبير الچينى للچين المنقول لإنه ربما يكون لهذه البروتينات الكابتة تأثير سام على الخلايا حقيقية النواة عند تواجدها بمستويات عالية ومع ذلك أمكن تحوير وتعديل النظام المستخدم فيه التتراسيكلين كمحفز لاستبعاد إنتاج المستوى العالى من البروتين الكابت الذى ينتجه الچين الكابت (Tet R) ولقد تم إعادة بناء حاملات (Vectors) الچينات المنقولة البلازميدية وكذلك الحاملات الڤيرسية بكل مكونات نظام اوبرون المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين (Tet operon) بالإضافة إلى الچين المنقول وكلونتها (Cloning) فى الحيوان المراد تعديله چينياً.

<u>ثالثاً: تنظيم التعبير الچينى للچين المنقول عن طريق مستقبلات هرمون الاسترويد</u>

<u>Transgene regulation via streroid receptors</u>

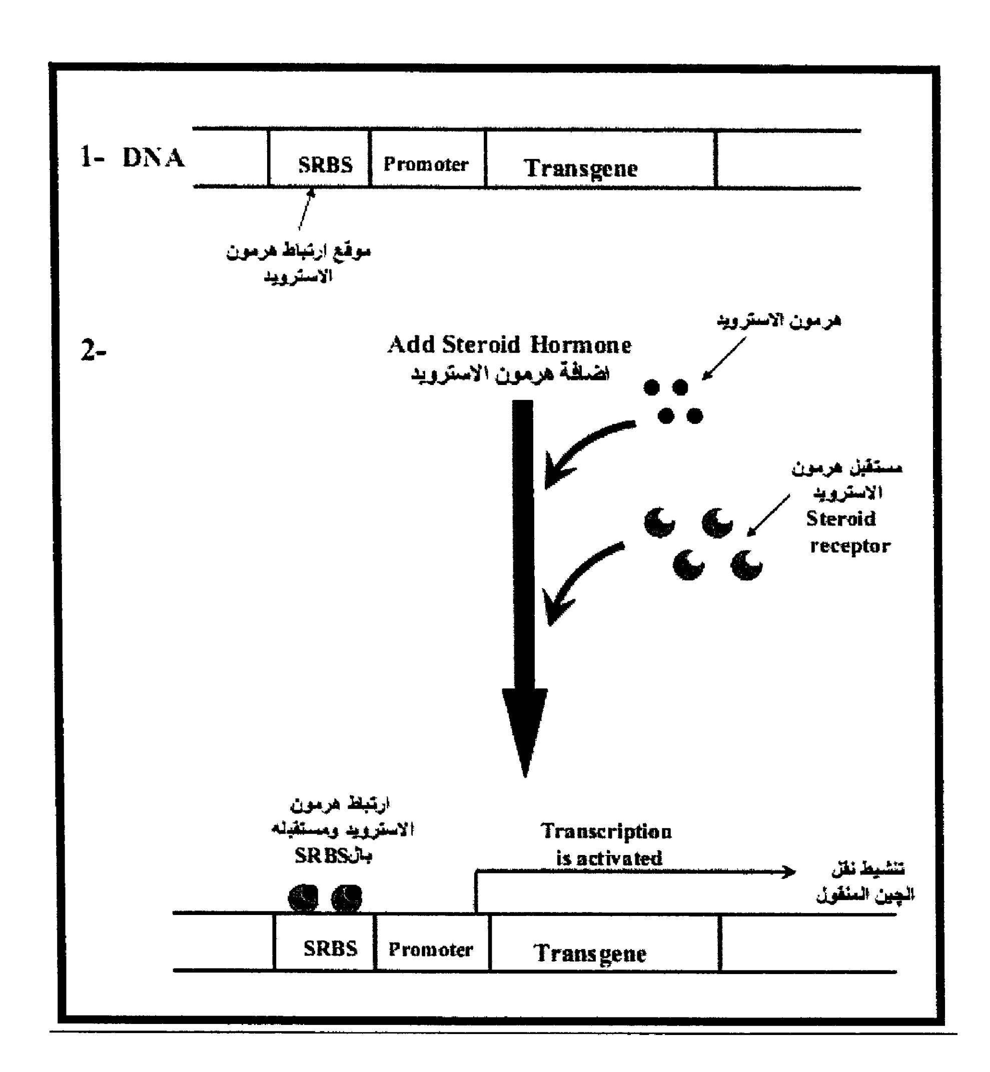
من بين أحد مشاكل استخدام جزيئات المضاد الحيوى التتراسيكلين كمحفز لتنظيم التعبير الچينى للچين المنقول (T.G.) أنها غالباً ما تنفذ إلى الأنسجة بطريقة غير متساوية بينما تنفذ جزئيات هرمون الاسترويد من الأغشية الخلوية بصورة سريعة وأنه بمجرد دخولها داخل الخلية

ترتبط بالبروتينات المستقبلة الموجودة بالخلية والتى توجه جزيئات هرمون الاسترويد للارتباط مباشرة بالـــDNA وبالتالى يمكن استخدامها فى تنظيم التعبير الچينى للچين المنقول فضلاً عن أنه يحدث إزالة لجزيئات هرمون الاسترويد خلال عدد قليل من الساعات وعلى ذلك فإنها تعتبر أكثر أهمية لتحفيز التعبير الچينى للچين المنقول. ومع ذلك يوجد جدل حول استخدام هذا الهرمون تتعلق بتحفيزه التعبير الچينى لچينات العائل الأخرى والتى تستجيب لهذا الهرمون. وأحد الطرق المستخدمة لتجنب تأثيره فى تحفيز چينات العائل الأخرى هو استخدام هرمون استرويد لا يوجد بصورة طبيعية فى الحيوان العائل المراد تعديله چينياً مثل استخدام هرمون اكديسون (Ecdysone) والمعزول من الحشرات لتنظيم التعبير الچينى فى الثدييات أو الحيوانات المعدلة چينياً وكذلك العكس صحيح وهو استخدام هرمون جليكوكورتيكويد (Glucocorticoid) المعزول من الثدييات لتنظيم التعبير الچينى فى الحشرات والنباتات المعدلة چينياً وعلى ذلك يجب أن يحتوى بناء قطعة الـــDNA التى تستخدم لهذا الغرض على ما يلى:

١ – الچين المنقول (T.G.).

٢ – البروموتور الخاص بالچين المنقول.

٣ – قطعة الـــDNA التى يرتبط بها هرمون الاسترويد والمعروفه باسم Steroid Receptor Binding Site (SRBS) ولتنظيم التعبير الچينى للچين المنقول بواسطة هرمون الاسترويد يكون بمعاملة الحيوان المعدل چينياً بهرمون الاسترويد والذى ينفذ عبر الغشاء الخلوى ويرتبط بالبروتين المستقبل الخاص به ثم بعد ذلك ينتقل المركب المكون من الهرمون ومستقبله إلى النواة ليرتبط ببروموتور الچين المنقول ومن ثم يظهر التعبير الچينى للچين المنقول (شكل ٨٣).



شكل (٨٣): يوضح تنظيم التعبير الجينى للجين المنقول Transgene (T.G.) بواسطة هرمون الاسترويد.

١ – الـــ DNA الذى يحتوى على الجين المنقول (T.G) والبروموتور (Promoter) وموقع ارتباط هرمون الاسترويد

٢– اضافة هرمون الاسترويد والذى يرتبط بالمستقبلات ويتحول إلى جزيئات مزدوجة (Dimers) تستطيع الارتباط بموقع الارتباط (SRBS) بالـــDNA وبذلك يحدث تنشيط لنسخ الجين المنقول.

الحشرات المعدلة چينياً Transgenic insects (T.G.I.)

يوجد عديد من أنواع الحشرات المعدلة چينياً (T.G.I) ومن بينها حشرة الدروسوفيلا والتى درست على المستوى الجزيئى لفترة طويلة مما جعلها متاحة لإدخال الچين المنقول إلى كروموسومات هذه الحشرة. ولقد أوضحت وأكدت الدراسات على تنقل بعض قطع الـDNA الكروموسومى من مكان لآخر داخل چينوم (DNA) هذه الحشرة وكذلك فى حشرات أخرى والتى تعرف بالعنصر المتنقل P. والحشرات التى تحتوى على العنصر المتنقل P يكون تكرار تنقله منخفض جداً بسبب تخليق البروتين الكابت (Repressor) الذى توجد شفراته على العنصر P. وعندما يجرى التزاوج بين ذكور تحمل العنصر (P) وإناث لا تحمله يرتفع معدل تكرار قطع الـDNA المتنقلة بصورة كبيرة فى البيض المخصب لفترة قصيرة من الوقت وذلك لنقص البروتين الكابت. ويسبب الانتقال العشوائى للعنصر P بين الكروموسومات معدل مرتفع من الطفور ونسبة منخفضة من النسل الطبيعى.

ويوجد على جانبى العنصر (P) ما يقرب من ٣١ وزج من المكررات المعكوسة (Inverted repeats) والتى يمكن إدخال الچين المنقول بينها وبذلك يمكنه أن يتنقل من مكان لآخر وعلى ذلك فإن هندسة العنصر (P) بالچين المنقول يصبح من الممكن استخدامه كحامل (Vector) فى نقل الچين المنقول بين سلالات حشرة الدروسوفيلا أو بين أنواع أخرى من الحشرات كذلك يمكن استخدام طريقة الحقن الدقيق للچين المنقول فى أجنة سلالات من الدروسوفيلا لا تحتوى على العنصر المتنقل P. وفى حشرة الدروسوفيلا تنقسم نواة الجنين الثنائية الناتجة من اندماج نواة الحيوان المنوى الأحادية بنواة البيضة الأحادية انقسامات ميتوزية عديدة دون حدوث الانقسام الخلوى وينتج عن ذلك تكون خلية عملاقة (Giant cell) تحتوى على عديد من الأنوية الثنائية وتعرف باسم سينسيتيم (Syncytium) وعادة يجرى الحقن الدقيق للچين المنقول فى هذه المرحلة حيث يحدث إدماج للچين المنقول فى أحد هذه الأنوية الثنائية والتى تنقسم وتنمو لتعطى أنسجة من بينها بادئات النسيج التناسلى (شكل ٨٤). ويمكن إدخال الچين المنقول من الناحية العملية فى حشرة

الدروسوفيلا بواسطة العنصر المتنقل (P) من خلال حمله بواسطة بلازميد بكتيرى. وعملياً يستخدم فى ادخال الچين المنقول فى چينوم DNA حشرة الدروسوفيلا بلازميدين معاد توليفهما هما:

١ – البلازميد المساعد (Helper plasmid) والذى يحمل الچين الذى ينتج إنزيم Transposase كما يحمل هذا البلازميد العنصر P الذى يحتوى على نقص جزئى فى أحد المكررات المعكوسة ولكنه ينتج إنزيم الـــTransposase الفعال وظيفياً (شكل ٨٤) وبذلك فإنه لا ينتقل بنفسه إلى كروموسومات الحشرة العائلة.

٢ – البلازميد الحامل (Vector plasmid) ويحتوى على الچين المنقول (T.G.) بالإضافة إلى الچين المخبر أو الچين الكاشف (Markers gene) وهو چين لون العين الحمراء ينقصه چين إنتاج إنزيم الـــTransposase وبذلك يعتمد تنقل العنصر P الذى يحمل الچين المنقول على البلازميد المساعد. وبمجرد ان يحدث ادماج العنصر P وما يحمله من الچين المنقول فى موقع معين من كروموسوم الحشرة فإنه لا ينتقل فى الاجيال التالية لعدم احتوائه على الچين الذى ينتج إنزيم الـــTransposase وبالتالى سوف يورث بطريقة ثابتة. ويمكن الكشف عن العنصر P وما يحمله من الچين المنقول باستخدام الچينات الكاشفة maker genes مثل چين المقاومة للمضاد الحيوى النيوميسين (Neomycine) او استخدام چينات لون العين للتحقق من وجود العنصر P وما يحمله من الچين المنقول. فاذا كان چين لون العين الحمراء هو الچين الكاشف فإن نسل الحشرات المعدلة چينياً حمراء العين تدل على ان الچين المنقول قد تم ادماجه فى النسيج التناسلى وبالتالى فإن كل خلايا النسل المعدل چينياً سوف تحتوى على الچين المنقول (Transgene) (شكل ٨٤). وتتلخص خطوات الحصول على حشرات معدلة چينياً فيما يلى:

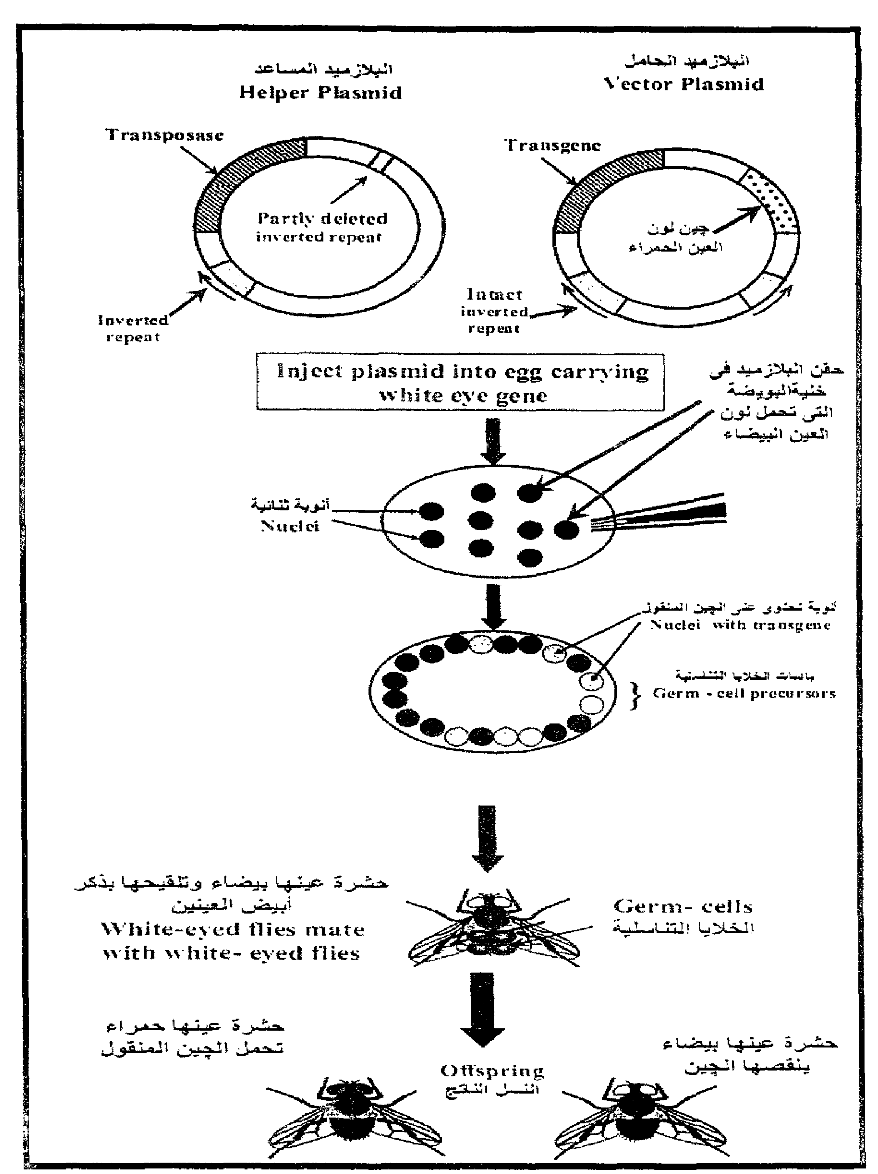
١. حقن البلازميدين السابقين فى الطرف الخلفى لخلية البيضة المخصبة التى تحمل چين لون العين البيضاء تحتوى ما بين ٢٠٠ إلى ٤٠٠ نواة ثنائية داخل نفس الغشاء الخلوى وإنتاج إنزيم Tranposase بواسطة البلازميد المساعد الذى يحفز الانتقال العشوائى للچين المنقول والچين الكاشف فى كروموسومات مختلفة فىالأنوية المختلفة وقد يحدث هذا الادماج فى أنوية خلايا النسيج التناسلى(Germ line) .

٢. يسمح لخلية البيضة بالنمو وتكوين حشرة كاملة النمو وستكون ذات عينين لونهما بيضاء (white eyes) والناتجة من تزاوج ذكر وانثى عينهما بيضاء.

٣. تزاوج الحشرة السابقة مع حشرة أخرى من نفس النسل ذات عينين لونها بيضاء فإذا ظهر بالنسل حشرات ذات عينين لونها حمراء (الچين الكاشف) فإن ذلك يدل على نجاح ادخال الچين المنقول (Transgene) فى الخلايا التناسلية (Germ line)

إنتاج أغنام معدلة چينياً Production of transgenic sheep

أمكن باستخدام تكنولوچيا نقل الچين إنتاج أغنام مهندسة چينياً بإدخال الچين البشري المسئول عن تخليق البروتين البشري المعروف باسم α-1-antitrypsin في نواة الإسبرم الموجودة في خلية البيضة المخصبة وقبل اندماجها مع نواة البيضة لتكوين الزيجوت. وبعد انقسام خلية البيضة المخصبة (الزيجوت) عدة انقسامات لتكوين كتلة من الخلايا وذلك في المعمل نقلت هذه الكتلة من الخلايا إلى رحم الأم الخاضعة ليكتمل نمو الجنين وفي النهاية ولدت الأم الخاضعة هذا الحيوان المعدل جنينياً والذي يحمل الچين المرغوب وبذلك تستطيع هذه الأغنام المعدلة چينياً من إفراز هذا البروتين البشري في ألبانها. وهذا البروتين يثبط عديد من إنزيمات هدم البروتينات proteases والذي يستعمل في علاج حالات إنتفاخ الرئة (Emphysema) وكذلك تليف الكبد (Cirrhosis).



شكل (٨٤): يوضح خطوات إنتاج حشرات معدلة چينياً (T.G.I.) باستخدام نوعين مختلفين من البلازميدات المعاد توليفها بالچين المنقول والچين المخبر أو الچين الكاشف (Marker gene)

إنتاج أبقار معدلة چينياً Production of transgenic cows

استطاع العالم Ian Wilmut ومعاونيه إنتاج بقرة معدلة چينياً سميت باسم روزي (Rosie) تقوم بإفراز البروتين البشري المعروف باسم Alpha lactalbumin وذلك بإدخال الچين الذي ينتج هذا البروتين في أحد كروموسومات نواة الإسبرم الموجود في خلية البيضة المخصبة وقبل اندماجها بنواة البيضة وتمكن هذا العالم ومعاونيه من الحصول على هذه البقرة المعدلة چينياً بالچين الذي ينتج هذا البروتين البشري حيث يفرز هذا البروتين مع إفراز اللبن. وهذا البروتين يحتوي على كل الأحماض الأمينية تقريباً والتي يحتاج إليها الأطفال حديثي الولادة ويجرى تنقية هذا البروتين من الكبد ويباع في صورة مسحوق يستعمل في تغذية الأطفال الذين يولدوا غير مكتملي النمو والمعروفين بالأطفال المبتسرين.

كذلك استطاعت إحدى شركات التقنية الحيوية في نيوزيلاندا من إنتاج أبقار معدلة چينياً باستخدام نفس الطريقة السابقة. وكانت هذه الأبقار المعدلة چينياً تحمل نسخ إضافية من الچينين اللذان ينتجان نوعين من بروتين اللبن وهما بيتا كازين β-casein وكابا كازين κ-casein. ووجد أن هذه الأبقار المعدلة چينياً تنتج ألباناً ارتفعت فيها نسبة البروتين بيتا كازين بنسبة ٨% كما ارتفعت نسبة البروتين كابا كازين إلى الضعف كما ارتفعت النسبة الكلية لبروتين اللبن بمقدار ١٣% مقارنة بألبان الأبقار غير المعدلة چينياً. وبمتابعة هذه الأبقار المعدلة جيبناً وجد أنها ظلت خلالها نسبة البروتين الكلي في اللبن مرتفعة. ومما لاشك فيه أن الألبان ذات المحتوى المرتفع من البروتين سوف تؤدي إلى انخفاض تكلفة إنتاج منتجات الألبان مثل الجبن والزبادي وذلك لأن ارتفاع نسبة البروتين باللبن سوف تؤدي إلى استخدام كمية أقل من اللبن لإنتاج نفس كمية الچبن مقارنة بمثيلاتها من الألبان العادية الناتجة من الأبقار غير المعدلة چينياً.

وفي الوقت الحالي تجرى محاولات عديدة لاستخدام الأبقار والأغنام والماعز والأبل لإنتاج حيوانات معدلة چينياً تنتج في ألبانها أحد العقاقير أو أحد الأمصال أو أحد الهرمونات البشرية والتي تستخدم في مقاومة وعلاج بعض الأمراض الوراثية في الإنسان.

الدواجن المعدلة چينياً Transgenic Poultry

تستخدم طرق التربية التقليدية لتحسين الدواجن وذلك بالتهجين بين السلالات التي تحتوي على الچينات المرغوبة وتلك التي تحتوي على چينات غير مرغوبة متبوعاً بالانتخاب للأفراد التي تحمل توليفة اعتباطية من الچينات المرغوبة. وهذه الطريقة من طرق التربية التقليدية من التهجين والانتخاب لأفضل التراكيب الچينية تحتاج إلى سنوات عديدة وتكلفة كبيرة. فعلى سبيل المثال إذا كانت هناك سلالات من الدواجن بها كل الصفات المرغوبة ولكن ينقصها صفة المقاومة لأحد الأمراض وتوجد سلالة أخرى تحمل الصفات الرديئة لمعظم صفاتها التجارية ولكنها مقاومة وراثياً لهذا المرض. وعلى ذلك فإن التهجين بينهما ينتج عنه نسلاً يحتوي على كل الصفات الموجودة في السلالتين وباستخدام طريقة التربية بالتهجين الرجعي بين أفراد الجيل الأول والسلالة الجيدة يمكن الحصول في النهاية على سلالة تحمل الصفات المرغوبة بالإضافة إلى الصفة الوراثية المقاومة للمرض. ومع ذلك فإن هذه الطريقة من طرق التربية التقليدية تحتاج إلى سنوات طويلة وتكلفة كبيرة.

ولكن باستخدام تكنولوچيا نقل الچين وطرق الهندسة الوراثية فإنه يمكن عزل وفصل الچين المرغوب الذى يتحكم في صفة المقاومة لأحد الأمراض وإدخاله في أحد كروموسومات دجاجة بها چينات الصفات المرغوبة. وتجرى هذه العملية بحقن وإدخال الچين المرغوب (چين المقاومة للمرض) في خلية البيضة المخصبة بنواة الإسبرم وقبل إندماج النواتين (نواة الإسبرم ونواة البيضة) معاً لتكوين الجنين وبذلك ستكون كل وجميع الخلايا الناتجة والمكونة لجسم الدجاجة بما فيها النسيج التناسلي تحتوي على الچين المرغوب أو الچين المنقول وتصبح الدجاجة الناتجة معدلة چينياً (Transgenic poultry) ومنها يمكن الحصول على سلالة من الدجاج معدلة چينياً بالچين المرغوب. وتستغرق هذه العملية وقتاً قصيراً وذلك بالمقارنة لطرق التربية التقليدية.

ومن ناحية أخرى فإن العقبات التي تواجه إنتاج دواجن معدلة چينياً باستخدام طرق التقنية الحيوية هي صعوبة الحصول على خلية البيضة المخصبة لهشاشتها واحتوائها على كميات كبيرة

من المُحْ (Yolk) والذي يعيق الوصول إلى خلية البيضة المخصبة لذلك يلجأ الباحثون إلى استخدام طريقة بديلة وهي التعامل مع الجنين في المرحلة الجنينية المبكرة وهي مرحلة البلاستودرم (Plastoderm) حيث يتم عزل الچين المرغوب في هذه الخلايا باستخدام طرق التقنية الحيوية المتبعة في ذلك وبذلك نحصل على خلايا معدلة چينياً بالچين المرغوب والتي يتم زراعتها بجوار خلايا البلاستودرم لجنين السلالة المراد تحسينها وراثياً وتصبح جزء من هذا الجنين والتي تنقسم مع انقسامات خلايا الجنين لتكوين جسم الفرد الجديد الناتج من نمو هذا الجنين وبذلك يصبح جسم الدجاجة الناتجة من ذلك يحتوي على أنسجة غير معدلة چينياً وأخرى معدلة چينياً ومثل هذا الكتكوت وما ينشأ عنه من دجاجة تعرف بالدجاجة الكيميرية (Chimeric chicken). وإذا حدث إن نشأت الأنسجة التناسلية (المبيض والخصية) من الخلايا المعدلة چينياً فإن ذلك يضمن انتقال الصفة الجديدة (الچين المنقول) إلى النسل الناتج وبذلك يتحقق الوصول إلى سلالة من الدجاج المعدل جنينياً تحمل الچين المرغوب.

ومن الصفات التي يمكن تحسينها باستخدام التقنيات الحيوية والهندسة الوراثية في الدواجن صفات عديدة منها الصفات التي تتحكم في زيادة معدل النمو وعدم تخزين الدهن وزيادة القدرة الهضمية وتوسيع نطاق المواد الغذائية التي تستطيع هضمها وكذلك تخزين عديد من العقاقير الطبية الدوائية من المبيض.

ولقد تم إنتاج أول دجاجة معدلة چينياً باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية في بريطانيا بإدخال الچين الذي ينتج هرمون النمو والمتحصل عليه من الأبقار وسميت هذه السلالة المعدلة چينياً بهذا الهرمون باسم الدجاجة الفائقة (Super-chicken) وذلك في التسعينات من القرن العشرين. كذلك تستهدف تكنولوچيا نقل الچين إلى الدجاج تلك الچينات المتعلقة بزيادة القدرة الهضمية وزيادة نطاقها ومنها تلك الچينات التي تنتج إنزيمات تحليل السيليولوز (Cellulose) وإنزيم تحليل الدهون (Lipase).

وتجرى حالياً محاولات إنتاج دواجن معدلة چينياً بإدخال الچين المرغوب إلى نواة الحيوان المنوي لتقوم بنقل الچين المرغوب إلى نواة البيضة بعد حدوث الإخصاب وبذلك نحصل على جنين معدل چينياً بالچين المرغوب والذي يعطي في النهاية دجاجة معدلة چينياً. ولقد تقدمت بحوث

وتقنيات الهندسة الوراثية في مجال الدواجن حتى أصبح العديد من العلماء المشتغلين في هذا المجال على قناعة من أنه في خلال السنوات القليلة القادمة سوف يكون هناك سلالات من الدواجن معدلة جينياً ومتاحة على النطاق التجاري.

مخاطر الدواجن المعدلة جينياً

على الرغم من أن إنتاج دواجن معدلة جينياً تحمل في طياتها كثير من الخير إلا أنه يجب الأخذ في الاعتبار ما قد ينتج عن نقل الجين إلى الدواجن بعض السلبيات. فعلى سبيل المثال ينتج عن إنتاج دواجن معدلة جينياً بهرمون النمو زيادة في في وزن الدجاج مما يترتب عليه تحميل أرجل الدجاج بهذه الأوزان الزائدة مما يترتب عليه ارتفاع نسبة الإصابة بمرض عسر الهيكل الغضروفي لعظام الأرجل والمعرف باسم Tibial dyschondroplasia وهو حالة مرضية تصيب عظام الأرجل الصغيرة يصيبها بالشروخ والكسور مما يعيق حركة الدجاجة وكذلك ارتفاع معدل موت الدجاج ونشوء بعض الحالات المرضية مثل تلك المرتبطة باستخدام الرتروفيروسات (Retroviruses) كحامل للجين المرغوب والتي تتمثل في ارتفاع نسبة ظهور سرطان الدم والغدد الليمفاوية في الدواجن المعدلة جينياً وهي اعتبارات يمتلك العلم والعلماء أدوات التحكم فيها.

استنساخ ذكور الفئران من خلايا قمة الذيل البالغة

Cloning of male mice from adult tail-tip cells

في العقد الأخير من القرن العشرين تم بنجاح استنساخ الحيوانات من الخلايا الجسمية البالغة في الأغنام والفئران والأبقار. وكل هذه الحيوانات المستنسخة السابقة والمشتقة من الحيوانات البالغة تم استنساخها باستخدام خلايا الغدد الثديية البالغة أوباستخدام بعض الخلايا الجسمية للنسيج التناسلي وذلك من خلال الاستزراع النووي لأنوية الخلايا الجسمية من الحيوانات الواهبة في خلايا البويضات (Egg cells) منزوعة النواة.

وفي عام ١٩٩٩ استطاع العالمين Teruhikow Kayama و Ryuzo Yanagimachi استنساخ ذكور الفئران باستخدام خلايا قمة الذيل البالغة من الذكور وتتلخص هذه الطريقة في النقاط التالية:

١- استخدام إناث من الفئران ذات فراء أسود عمرها ما بين ثمانية إلى عشرة أسابيع وتحفيزها من أجل التبويض للحصول منها على خلايا البويضات الأولية (Oocytes).

٢- أزيلت كروموسومات الدور الاستوائي الثاني (Metaphase II) من خلايا البويضات الدولية وبذلك تصبح هذه الخلايا عديمة النواة.

٣- عزلت الخلايا الواهبة للأنوية الجسمية من خلايا قمة الذيل من فأر ذكر بالغ ذو فراء أجوتي عمره ما بين ١٠ إلى ١٢ أسبوع وعزل الأنوية الثنائية من هذه الخلايا الجسمية.

٤- إجراء الحقن الدقيق (Micro injection) بكل نواه من هذه الأنوية المأخوذة من خلايا قمة الذيل بكل خلية من خلايا البويضات الأولية منزوعة النواة والسماح لهذه الخلايا بالنمو على بيئة خاصة لتكوين الأجنة.

٥- نقل الأجنة المتكونة والتي تحتوي ما بين خليتين إلى ثمانية خلايا وهي مرحلة البلاستوسيست (Blastocyste) إلى رحم الأم الحاضنة (Foster matter) وكانت ذات فراء أبيض.

٦- وجد أنه ما بين ٥٠% إلى ٥٨% من خلايا البويضات الأولية منزوعة النواه والتي حقنت بالأنوية المأخوذة من خلايا قمة الذيل للذكر الواهب نمت حتى البلاستوسيست وذلك في أنبوبة الإخصاب (In vitro).

٧- وجد أنه من بين ٢٧٤ حالة من الأجنة المتكونة في أنبوبة الاختبار والتي ثم نقلها إلى رحم الأمهات الحاضنات إن ثلاثة أجنة فقط هي التي استكملت نموها ووصلت إلى مرحلة النمو النهائية داخل رحم الأمهات الحاضنات وبعد الوضع ظلت هذه الفئران الثلاثة في الحياة وكانت جميعها ذات فراء أجوتي وهو لون فراء الذكر الواهب للخلايا الجسمية والتي استخدمت في الاستنساخ.

ولقد أوضحت هذه الدراسة أن استنساخ الحيوانات باستخدام الخلايا الجسمية البالغة ليس محدداً بالإناث أو باستخدام الخلايا الجسمية للنسيج التناسلي للإناث وأنه يمكن استنساخ الذكور أيضاً باستخدام الخلايا الجسمية وعلى ذلك فإنه يمكن تخزين جينومات (Genomes) الفئران في صورة خلايا جسمية بالغة مثل خلايا قمة الذيل بصورة أفضل من استخدام الجاميطات أو الزيجوتات أو الأجنة.

الباب العاشر

هندسة چينات الكائنات حقيقية النواة فى البكتيريا

Engineering Eukaryotic Genes In Bacteria

تستخدم حالياً البكتيريا وخاصة بكتيريا القولون (*E. coli*) المهندسة چينياً ببعض الچينات التى مصدرها الكائنات حقيقية النواة كمصانع بيولوجية لإنتاج بعض الهرمونات والبروتينات الهامة بكميات كبيرة وضخمة وبطريقة اقتصـــادية . ويستخدم البلازميدات البكتيرية (Bacterial plasmid) كحاملات (Vectors) لنقل وإدخال الچين المكلون (.Cloned gene (C.G فى البكتيريا العائله. والبلازميدات البكتيرية هى جزيئات دائرية من الـــDNA مزدوجة الخيط. وتستخدم البلازميدات البكتيرية لنقل وادخال الچين المكلون (.C.G) بعد اعادة توليفها مرة أخرى وتكوين ما يعرف بالبلازميد المعاد توليفه (.R.P) والتى يجب أن تصمم بحيث تحتوى على ما يلى:

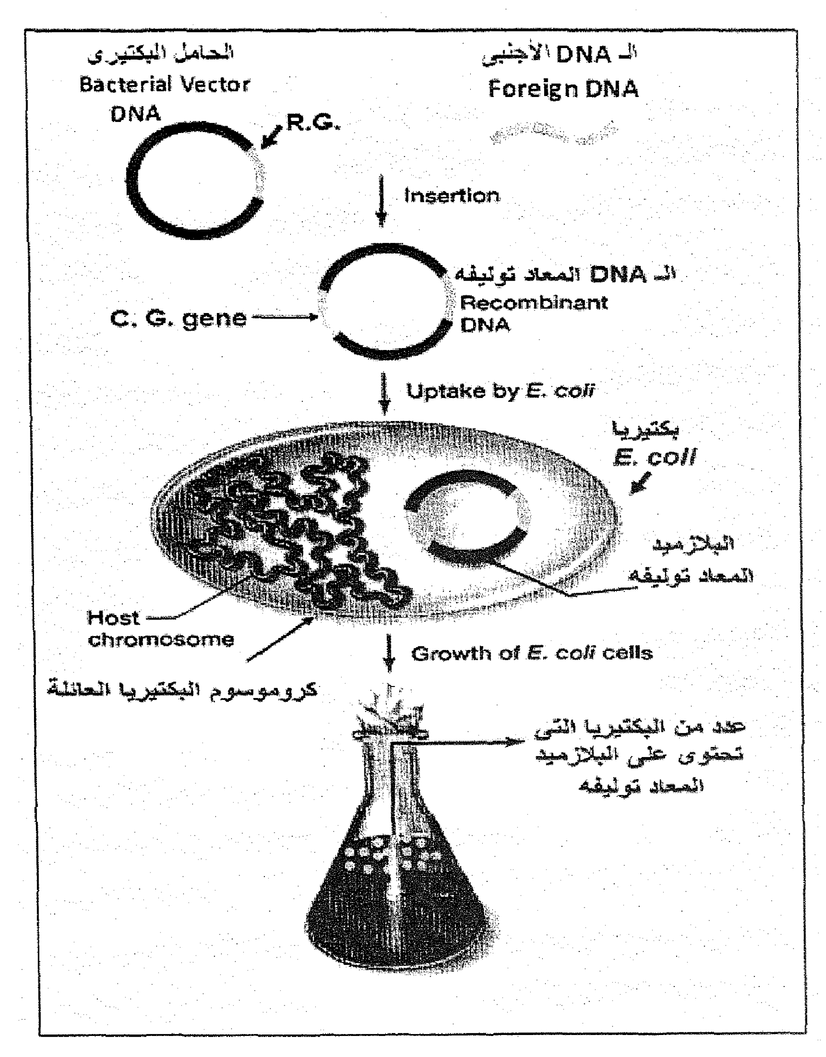
١- العناصر اللازمة لتضاعفه وتكاثره داخل الخلية البكتيرية العائلة.

٢- الچين المكلون (.Cloned gene (C.G أو الـــDNA الأجنبى (Foreign DNA)

٣- الچين المخبِر (.Reporter gene (R.G وهو چين المقاومة لأحد المضادات الحيوية البكتيرية.

وتسمى السلالة البكتيرية التى تحتوى على الچين المكلون (.C.G) والذى يظهر تعبيره الچينى داخل الخلية البكتيرية العائله باسم الكلون (Clone) وهذه السلالة البكتيرية التى تحتوى على الچين الأجنبى أو الچين المكلون الذى مصدره كائنات حقيقية النواة لا تتواجد فى الطبيعة والخطوات المتبعة فى الحصول على مثل هذه الكلون البكتيرية (Bacterial clone) هى (شكل ٨٥):

١- الحصول على الچين المراد كلونته (.C.G) أو الـــDNA الأجنبى
٢- استخلاص البلازميد البكتيرى الذى يستخدم كحامل (Vector) فى نقل وإدخال الچين المكلون إلى البكتيريا العائلة الذى يحتوى على الچين المخبر (R.G) وهو چين المقاومة لأحد المضادات الحيوية.
٣- كسر هذا البلازميد البكتيرى عند منطقة واحدة باستخدام أحد إنزيمات الكسر المحدد(.R. E).
٤- ربط أو وصل (Joining) الچين المكلون (.C.G) بالبلازميد البكتيرى باستخدام الطرق المتبعة فى ذلك والتى سبق شرحها للحصول على بلازميد معاد توليفه (.R.P) يحتوى على الچين المكلون أو الـــDNA الأجنبى.
٥- يتم ادخال هذا البلازميد المعاد توليفه (.R.P) فى الخلايا البكتيرية النامية على بيئة غذائية وهذه الخلايا البكتيرية يجب أن تكون حساسه للمضاد الحيوى البكتيرى. ويساعد فى ادخال البلازميد والمعاد توليفه فى الخلايا البكتيرية النامية والحساسه للمضاد الحيوى وجود كلوريد الكالسيوم فى البيئة الغذائية.
٦- يسمح للخلايا البكتيرية بالنمو على هذه البيئة الغذائية لفترة من الزمن لتكوين مستعمرات بكتيرية.
٧- يضاف المضاد الحيوى البكتيري إلى هذه البيئة الغذائية ويؤدى ذلك إلى قتل جميع الخلايا البكتيرية التى لم تحصل على البلازميد المعاد توليفه (.R.P) بينما تبقى وتستمر فى النمو الخلايا التى حصلت على البلازميد المعاد توليفه وما يحمله من الچين الملكون (.C.G).
٨- إنتخاب السلالة البكتيرية التى تحتوى على الچين المكلون ومثل هذه الكلون (Clone) لا تتواجد فى الطبيعة. وإذا ظهر التعبير الچينى للچين المكلون فى الخلايا البكتيرية فسوف تنتج كميات كبيرة من ناتج هذا الچين.



شكل(٨٥): يوضح خطوات كلونة (Cloning) البكتيريا E-coli بالـ DNA الأجنبي بإعادة توليف الحامل البكتيري (Bacterial Vector) وتكوين الـDNA المعاد توليفه بالچين أو الـDNA الأجنبي ودخوله الخلية البكتيرية والتى تنمو وتنقسم مكونة عديد من الخلايا البكتيرية المكلونة بالـDNA الأجنبي. وإذا حدث تعبير چيني للـDNA الأجنبي داخل الخلايا البكتيرية سوف تنتج كميات كبيرة من ناتج هذا الچين الأجنبي.

ولقد استخدمت البكتيريا المهندسة چينياً ببعض چينات الكائنات جقيقية النواة فى إنتاج بعض الهرمونات والبروتينات الهامة مثل هرمون الانسولين (Insulin) الإنسانى وهرمون النمو السوماتوستاتين (Somatostatin) وكذلك هرمون النمو الإنسانى السوماتوتروبين (Somototropin) بطريقة اقتصادية ، ومع ذلك توجد بعض العقبات التى تواجه التعبير الچينى للچينات المكلونة فى البكتيريا (*E. coli*) وخاصة عندما يكون مصدر هذه الچينات كائنات حقيقية النواة (Eukaryotes) ومن بين هذه العقبات التى أمكن التغلب عليها ما يلى:

ربما لا تستطيع البكتيريا الملكونة بالچين الأجنبى نسخ هذا الچين الأجنبى لصعوبة تعرف إنزيم بلمرة الــRNA البكتيرى (RNA polymerase) على الچين الأحنبى ونسخه ولقد أمكن التغلب على هذه العقبة بوضع بروموتور بكتيرى لأحد الچينات البكتيرية بجوار الچين الملكون وبالتالى يستطيع إنزيم البلمرة البكتيرى من التعرف على هذا البروموتور البكتيرى ونسخ الچين المكلون (C.G.).

ربما يتم نسخ الچين الملكون وتكوين الــhnRNA ولكن البكتيريا المكلونة لا تستطيع ترجمته إلى البروتين المناسب وذلك لاحتوائه على الانترونات (Introns) بالإضافة إلى الاكزونات (Exons) التى تترجم لأن البكتيريا المكلونة لا تحتوى عل الإنزيمات اللازمة لإزالة الأنترونات وتجميع الأكزونات معاً وتكوين جزئيى الــmRNA الناضج والذى يتم ترجمته إلى البروتين المناسب. وللتغلب على هذه العقبة يجب تجهيز الچين المكلون (C.G.) بالصورة التى تجعله خالياً من الانترونات وذلك عن طريق استخدام النسخ العكسى لجزيئات الــmRNA الناضجة أو الخالية من الانترونات بواسطة إنزيم النسخ العكسى وتخليق خيط مفرد من الــDNA يعرف باسم الــcDNA والذى يستخدم فى تخليق الچين المكلون والخالى من الانترونات.

١. ربما يتم نسخ الچين الملكون وتكوين الــ mRNA الناضج ويتم ترجمته إلى البروتين المناسب ولكن تقوم إنزيمات تكسير البروتين (Proteases) البكتيرية بتكسيره إلى وحداته البنائية من الأحماض الأمينية قبل فصله وعزله وتنقيته من البكتيريا الملكونة. وللتغلب على هذه العقبة يمكن استخلاص وتنقية البروتين الناتج من البكتيريا المكلونة بصورة سريعة قبل تكسيره وعموماً يجب تجهيز الچين المكلون قبل كلونته فى البكتيريا بالصورة التى تسمح بنسخه وترجمته بواسطة الريبوسومات البكتيرية إلى البروتين المناسب وكذلك استخلاصه وتنقيته من البكتيريا الملكونة بالكميات المناسبة. ولقد

استخدمت البكتيريا المكلونة وخاصة بكتيريا القولون (*E. coli*) كمصانع بيولوجية لإنتاج بعض هرمونات الإنسان وكذلك بعض البروتينات الهامة والتى من بينها ما يلى:

أولاً: البكتيريا المكلونة بچين هرمون السوماتوستاتين

Bacterial Clone with Somatostatin Gene

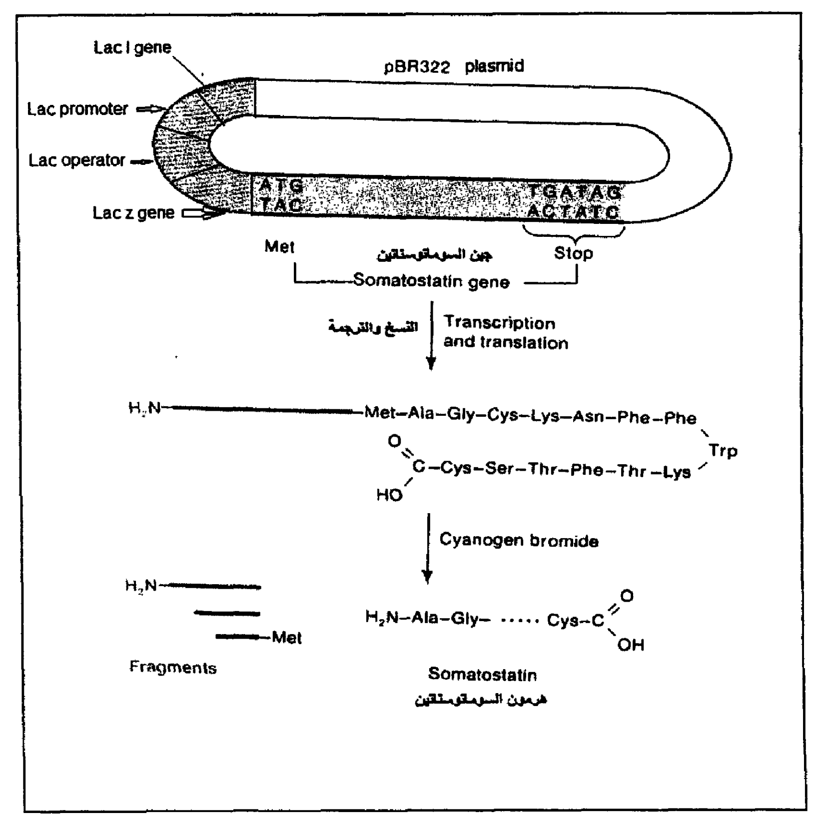
يعتبر هرمون السوماتوستاتين من أهم الهرمونات فى الإنسان حيث يعمل من خلال أرتباطه بهرمون السوماتوتروبين على تنظيم عملية النمو فى الإنسان . ونظراً لأهمية هذا الهرمون فى علاج بعض حالات اضطراب النمو فى الإنسان تم استخدام بكتيريا القولون المكلونة بچين إنتاج هذا الهرمون لإنتاجه بطريقة اقتصادية على النحو التالى:

١- تخليق الچين الذى ينتج هذا الهرمون صناعياً باستخدام الطرق الكيميائية ومن حسن الحظ أن هذه الهرمون يتركب من بروتين يحتوى على عدد قليل من الأحماض الأمينية عددها ١٤ حامض أمينى مما يسهل من التخليق الكيميائى لهذا الچين والذى يجب أن يحتوى على ٤٢ زوج من النيوكليوتيدات (٣×١٤) بترتيب معين ومحدد والتى تمثل الشفرات اللازمة لتتابع الأربعة عشر حامض أمينى فى هذا البروتين. ويضاف لهذا الچين المخلق صناعياً شفرة بداية الترجمة (TAC) كما يضاف إليه فى نهايته شفرتين من شفرات إنهاء الترجمة ACTATC (شكل ٨٦) وعلى ذلك سوف يبدأ الـــmRNA الناتج من نسخ هذا الچين بشفرة بداية الترجمة AUG والخاصة بالحامض الأمينى الميثيونين وينتهى بشفرتى نهاية الترجمة UGAUGA وبينهما الشفرات اللازمة للتعبير عن الأحماض الأمينية الأربعة عشر التى يتركب منها هرمون السوماتوستاتين.

٢- الحامل (Vector) المستخدم فى حمل هذا الچين هو البلازميد pBR322 المعاد توليفه حيث يحتوى على كل من بروموتور (Promoter) واوبريتور (Operator) والچين المنظم LacI لاوبرون اللاكتوز (Lac operon) وجزء من الچين Lac z الذى يحمل شفرات بعض الأحماض الأمينية بالطرف الذى يحتوى على مجموعة الأمينو من إنزيم β–galactosidase (شكل ٨٦).

٣- يتم ادخال چين السوماتوستاسين فى هذا البلازميد المعاد توليفه السابق باستخدام أحد إنزيمات القطع المحدد (R.E.) والتى تسبب كسر فى الچين Lac z مكوناً أطراف عمياء وبالتالى يحدث ربط أو

وصل چين السوماتوتروبين المخلق صناعياً ذو الأطراف العمياء فى نهاية الچين Lac z ويصبح هذا البلازميد المعاد توليفه محتوياً على چين السوماتوستايتن بالإضافة إلى كل من بروموتور واوبريتور وجزء من الچين Lac z لاوبرون اللاكتوز (Lactose operon).



شكل (٨٦): يوضح البلازميد pB322 المعاد توليفه بچين هرمون السوماتوستاتين وكل من الچين LacI وبروموتور واوبريتور وكذلك جزء من الچين Lac z لاوبرون اللاكتوز. وعند كلونة البكتيريا *E. coli* بهذا البلازميد المعاد توليفه تقوم بإنتاج هرمون السوماتوستاتين والمرتبط ببعض الأحماض الأمينية لإنزيم الـ β-galactosidase والتى يمكن فصلها عن الهرمون بالمعاملة بمركب بروميد السيانوچين (Cyanogen bromide) وبذلك نحصل على هرمون السوماتوستاتين النقي.

٤- ادخال هذا البلازميد المعاد توليفه السابق فى البكتيريا *E. coli* والحصول على سلالة بكتيرية مكلونة بهذا البلازميد المعاد توليفه والذى يحتوى على چين هرمون السوماتوستاتين. وهذه السلالة البكتيرية المكلونة (Bacterial clone) تقوم بإنتاج هرمون السوماتوستايتن ليس ذلك فقط ولكنها تقوم بإنتاج هذا الهرمون تحت النظام التحفيزى.

٥- عند إضافة المحفز إلى البيئة الغذائية التى تحتوى على البكتيريا المكلونة السابقة يحدث تحفيز لاوبرون اللاكتوز (Lac operon) وتنتج البروتين الذى يتركب من هرمون السوماتوتروبين مرتبط ببعض الأحماض الأمينية لإنزيم β–galactosidase.

٦- تنقية هذا البروتين الناتج من البكتيريا المكلونة السابقة ثم يجرى فصل وتنقية هرمون السوماتوستاتين بإضافة مركب بروميد السيانوچين (Cyanogen bromide) والذى يقوم بفصل هرمون السوماتوستاتين عن الأحماض الأمينية لإنزيم الـــβ–galactosidase وبذلك نحصل على هذا الهرمون فى صورة نقية.

ثانياً: البكتيريا المكلونة بچين هرمون السوماتوتروبين

Bacterial Clone with Somatotropin Gene

يعمل هذا الهرمون مع هرمون السوماتوستاتين على تنظيم عملية النمو فى الإنسان ويستعمل هذا الهرمون فى علاج بعض أمراض اضطراب النمو فى الإنسان وخاصة التقزم. ويتركب هذا الهرمون من بروتين يحتوى على ١٩١ حامض أمينى بترتيب محدد وبالتالى فإن الچين الذى ينسخ ويترجم إلى هذا البروتين يحتوى على تتابع نيوكليوتيدى محدد من ٥٧٣ نيوكليوتيده (٣ × ١٩١) تمثل الشفرات اللازمة لكل الأحماض الأمينية التى يتركب منها هذا البروتين. ولقد تم تخليق الچين الذى ينتج هذا البروتين صناعياً باستخدام الطرق الكيميائية ثم كلونته (Cloning) بعد ذلك فى بكتيريا القولون *E. coli* للحصول على بكتيريا مكلونة بهذا الچين باتباع نفس الخطوات السابقة فى كلونة البكتيريا بچين إنتاج هرمون السوماتوستايتن حيث أمكن الحصول على سلالة بكتيريه مكلونه بهذا الچين الذى ينتج هرمون السوماتوتروبين تحت النظام

التحفيزى بادخال هذا الچين فى اوبرون اللاكتوز كما هو الحال فى البكتيريا المكلونه بچين هرمون السوماتوستاتين عن طريق البلازميد pBR322 المعاد توليفه بهذا الچين وكل من بروموتور واوبريتور والچينLac I وجزء من الچين z لاوبرون اللاكتوز.

ثالثاً: البكتيريا الملكونه بچين هرمون الأنسولين

Bacterial Clone with Insulin Gene

يرجع مرض السكر إلى انخفاض تركيز هرمون الأنسولين (Insulin) فى الدم. وهذا الهرمون تنتجه الخلايا بيتا (β-cells) الموجودة فى البنكرياس ونظراً لأن هذا الهرمون يقوم بتنظيم تركيز سكر الجلوكوز (Glucose) فى الدم فإن انخفاض تركيز هذا الهرمون فى الدم يؤدى إلى ارتفاع تركيز سكر الجلوكوز فى الدم بدرجة قد تؤدى إلى الوفاة. وعادة ما يعالج المرضى بحقنهم بجرعات من هرمون الأنسولين المحضر من بنكرياس الخنازير أو الحيوانات المذبوحة، وعلى الرغم من فعالية هذا الهرمون إلا أنه بسبب الحصول عليه من حيوانات مختلفة فقد يسبب بعض الأعراض الجانبية غير المرغوبة كما أن عملية عزله وتنقيته من البنكرياس يعتريها كثير من التعقيد إلى جانب تكلفتها المرتفعة.

ونظراً لأن الأنسولين البشرى يكون أفضل من الأنسولين المستخلص من الحيوانات الأخرى فى علاج مرض السكر إلا أن عدم إمكانية الحصول عليه من الإنسان دفعت الباحثين فى مجال هندسة الچينات أو الهندسة الوراثية إلى استخدام بكتيريا القولون *E. coli* المكلونه بچين إنتاج هذا الهرمون فى إنتاجه بطريقة اقتصادية وبكميات كبيرة يمكن استخدامها فى الأغراض العلاجية. وينتج هرمون الأنسولين فى خلايا البنكرياس على صورة جزىء بريبروأنسولين (Preproinsulin) يحتوى على أربعة أنواع من السلاسل عديدة الببتيد على النحو التالى (شكل ٨٧) :

1- N-terminal signal sequence

وهى سلسلة عديدة الببتيد تحتوى على ١٦ حامض أمينى بتتابع محدد.

2- C-peptide

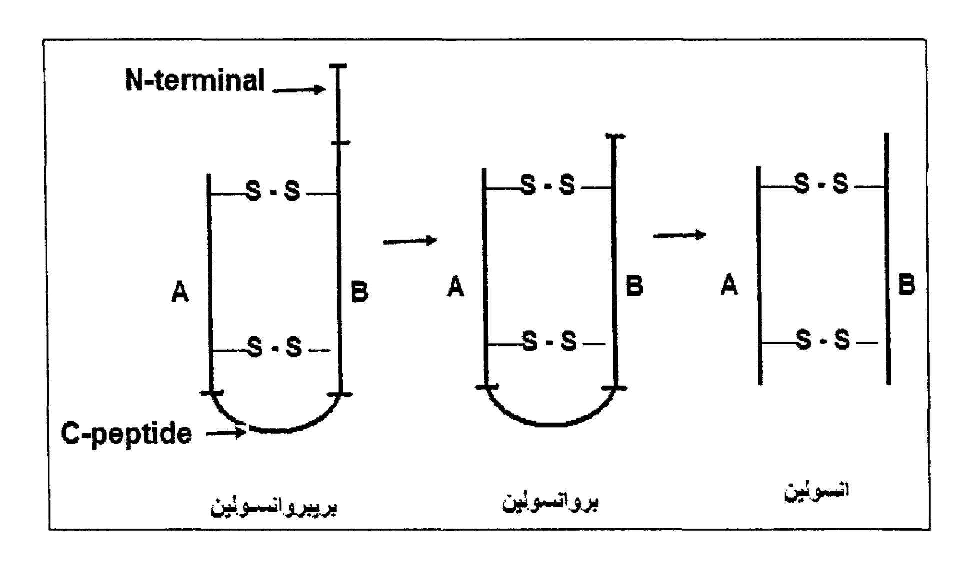
وهى سلسلة عديدة الببتيد تحتوى على ٣٣ حامض أمينى بتتابع محدد أيضاً.

3- A-chain

وهى سلسلة عديدة الببتيد تحتوى على ٢١ حامض أمينى بتتابع محدد كذلك.

4- B-chain

وهى سلسلة عديدة الببتيد تحتوى على ٣٠ حامض أمينى بتتابع محدد.



شكل (٨٧): يوضح إنتاج هرمون الأنسولين بواسطة خلايا البنكرياس فى صورة جزىءبريبروانسولين (Preproinsulin) وتحويله إلى جزىء بروأنسولين أولى (Proinsulin) ثم تحول الأخير إلى جزىء الأنسولين الفعال وظيفياً الذى يحتوى على كل من السلسلة عديدة الببتيد A و السلسلة عديدة الببتيد B فقط.

وتحدث تحورات لهذا الجزيء (بريبروأنسولين) تتمثل فى إزالة السلسلة عديدة الببتيد N-terminal signal وبذلك يتحول هذا الجزيء الأولى إلى جزيء بروأنسولين (Proinsulin) ويلى ذلك إزالة السلسلة عديدة الببتيد C-peptide وبذلك يتحول جزيئى البروانسولين (Proinsulin) إلى جزيء الأنسولين (Insulin) الفعال وظيفياً والذى يتركب فقط من كل من السلسلة عديدة الببتيد A والسلسلة عديدة الببتيد B (شكل ٨٧) وعلى ذلك تستخدم سلالتين بكتيريتين لإنتاج هرمون الأنسولين أحدهما يجب كلونتها بالچين A الذى ينتج السلسلة عديدة الببتيد A والسلالة الأخرى مكلونه بالچين B الذى ينتج السلسلة عديدة الببتيد B فقط بإتباع الخطوات التالية (شكل ٨٨):

١- تخليق الچين A صناعياً الذى يحتوى على التتابع النيوكليوتيدى الذى يحمل الشفرات اللازمة للتعبير عن الأحماض الأمينية الإحدى وعشرون حامض أمينى التى تدخل فى تركيب السلسلة عديدة الببتيد A أى تخليق الچين الذى يحتوى على التتابع النيوكليوتيدى المحدد المكون من ٦٣ زوج (٣×٢١) من النيوكليوتيدات باستخدام الطرق الكيمياوية.

٢- تخليق الچين B صناعياً الذى يحتوى على تتابع نيوكليوتيدى محدد مكون من ٩٠ زوج من النيوكليوتيدات (٣×٣٠) والذى يحمل الشفرات اللازمة للتعبير عن الأحماض الأمينية الثلاثين والتى تدخل فى تركيب السلسلة عديدة الببتيد B.

٣- كلونة كل من الچين A والچين B المخلقان صناعياً ببلازميد بكتيرى معاد توليفه (R.P.) يحتوى على الچين A او الچين B بجانب إحتوائه على الچين المخبر Reporter gene (R.G.) وهو چين المقاومة لأحد المضادات الحيوية البكتيرية وذلك لإنتخاب البكتيريا المكلونة بأى من الچينين A أو B.

٤- ومن الناحية العملية يتم تصميم البلازميد البكتيرى المعاد توليفه الذى يحتوى على الچين A أو الچين B بحيث يحتوى على بروموتور واوبريتور وجزء من الچين z لاوبرون اللاكتوز (La operon) ويتم إدخال الچين A أو الچين B بين موقع الاوبريتور Operator (O) والچين Z والذى ينتج إنزيم الـــ β.galactosidase وكذلك چين المقاومة للمضاد الحيوى الامبيسلين (AmpR) .

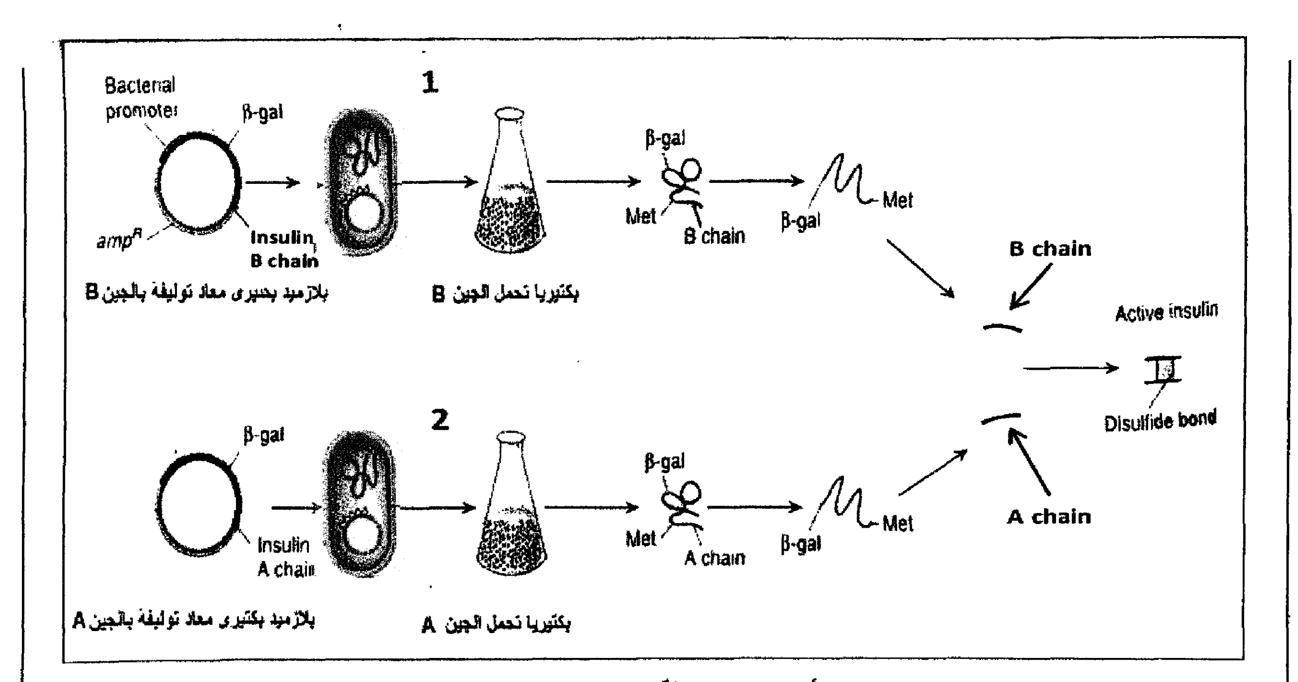
٥- إنتخاب البكتيريا المكلونة بأى من الچين A أو الچين B بإضافة المضاد الحيوى الامبيسلين إلى المزرعة البكتيرية.

٦- تقوم البكتيريا المكلونة بهذا البلازميد المعاد توليفه بالصورة السابقة والذى يحمل الچين A فى إنتاج السلسلة عديدة الببتيد A بينما تقوم السلالة الأخرى المكلونة بالبلازميد المعاد توليفه والذى يحمل الچين B فى إنتاج السلسلة عديدة الببتيد B تحت النظام التحفيزى.

٧- تنقية واستخلاص كلاً من السلاسل عديدة الببتيد A وكذلك السلاسل عديدة الببتيد B من كلا السلالتين البكتيرتين المكلونتين بأى من الچينين A أو B.

٨- خلط كلاً من النوعين من السلاسل عديدة الببتيد A و B معاً لتكوين هرمون الأنسولين الفعال وظيفياً.

ولقد خضع هذا الهرمون البشرى والمنتج بواسطة بكتيريا القولون المكلونة بچينات إنتاج هرمون الأنسولين لاختبارات عديدة من أجل التأكد من سلامة استعماله وبدأ تسويقه تجارياً فى عديد من البلدان مما جعله واحداً من أهم تطبيقات هندسة الچينات فى البكتيريا التى أخذت طريقها إلى حيز التنفيذ.



شكل(٨٨) : يوضح خطوات إنتاج هرمون الأنسولين بواسطة البكتيريا *E-coli*:

١-كلونة البكتيريا بالبلازميد المعاد توليفه بجين إنتاج السلسلة عديدة الببتيد B.

٢-كلونة البكتيريا بالبلازميد المعاد توليفه بجين إنتاج السلسلة عديدة الببتيد A.

حيث تقوم كلا السلالتين البكتيريتين بإنتاج كل من السلاسل عديدة الببتيد A و B بصورة مستقلة ثم تنقيتها وخلطهما معاً للحصول على هرمون الأنسولين الفعال وظيفياً.

الباب الحادى عشر

العلاج الچيني

Gene Therapy

العلاج الچيني هو أحد تطبيقات تكنولوچيا الـــ DNA المعاد توليفه المبتكرة والذي يقدم عديد من الوسائل واسعة الانتشار لعلاج العديد من الأمراض الوراثية.

ومن الناحية التاريخية أنه في سبتمبر عام ١٩٩٠ كانت الطفلتين أشاني Ashani وسينثيا Cynthia أول حالة من حالات العلاج الچيني في علاج مرض وراثي. فقد ورثت كل طفلة منهما الچين الطافر الذي يسبب نقص المناعة الخطير والذي يجعلهم غير قادرين على مقاومة العدوى الممرضة. وكان علاجهم الچيني بإمداد أي منهما ببلايين من الخلايا التي تحمل الچين الطبيعي والذي يوجه إنتاج البروتين الطبيعي والذي يعوض وجود البروتين الطافر غير الفعال وظيفياً والمنتج بواسطة الخلايا المريضة.

ويتضح من ذلك جلياً أن الفكرة الأساسية للعلاج الچيني تبدو سهلة جداً والتي تتمثل في إدخال الچين الطبيعي في الخلايا التي تحمل الچين الطافر. ومن الناحية النظرية أنه عندما يكون المرض الوراثي سببه چين مفرد طافر فإن علاجه يكون بطريقة مباشرة بالمعاملة بالچين الطبيعي عن طريق إدخال الچين الطبيعي والذي يقوم بصناعة البروتين الطبيعي الفعال وظيفياً والذي يقوم بالوظيفة المناسبة في الخلايا المريضة.

والمقدرة على وضع الخطة الناجحة للعلاج الچيني تعتمد على معرفة كينونة وطبيعة الچين الطافر والذي يسبب المرض كما تتطلب معرفة العلماء المعرفة الكاملة حول نظم التعبير الچيني والخطوات البيوكيميائية التي تحدث في كل من الخلايا السليمة والخلايا المريضة وذلك

لتصميم ووضع الطريقة المثلى للعلاج الجيني بما فيها الطريقة المثلى لتوصيل الجين العلاجي الطبيعي إلى الخلايا الهدف من جسم الإنسان.

وعلى الرغم من نجاح العلاج الجيني الأولى في علاج كل من الطفلتين أشاني Ashani وسينثيا Cynthia إلا أنه ظهرت كثير من نقاط الجدل حول العلاج الجيني في التسعينات من القرن العشرين والتي مازالت مستمرة حتى الآن حيث مازال يواجه كثير من الاعتراضات قبل أن يصبح علاج واسع الانتشار لعلاج بعض الأمراض الوراثية ومع ذلك استخدمت طرق العلاج الجيني الخاصة كعلاج ناجح لبعض الأمراض الوراثية المعينة حيث أن بعض حالات العلاج الجيني تم إجراؤها على حالات مرضية في الإنسان.

ومن بين أهم الاعتراضات التي تواجه استخدام العلاج الجيني هو الحاجة إلى وجود آلية آمنة لتوصيل الجين العلاجي. وهذه الآلية تتضمن وجود حامل (Vector) للجين العلاجي والذي يقوم بكل دقة بتوصيل الجين إلى الخلايا الهدف في جسم الأفراد المرضى. والحاملات (Vectors) المستخدمة في العلاج الجيني هي عبارة عن جزيئات من الـ DNA الفعالة في توصيل الجين العلاجي إلى الخلايا المريضة من جسم الإنسان. ولقد اشتقت هذه الحاملات من عديد من المصادر منها الـ DNA لجينوم الرتروڤيروسات (Retroviruses) والأدينوڤيروسات (Adenoviruses) وكذلك البلازميدات (Plasmids) البكتيرية من الـ DNA الدائرية ومزدوجة الخيط وكذلك كروموسومات الكائنات حقيقية النواة المصنعة معملياً.

ويوجد طريقتين رئيسيتين للعلاج الجيني والتي تعتمد على ما إذا كانت الخلايا المريضة تعالج داخل جسم المريض (In vivo) وفيها يجب استخدام طرق توصيل الجين العلاجي والتي توجه بكل دقة الجين العلاجي إلى خلايا خاصة من جسم المريض. أما إذا كان العلاج الجيني خارج جسم المريض (Ex vivo) فإنه يجب عزل وإزالة الخلايا المريضة من المرضى وإدخال الجين العلاجي بها في المعمل ثم إعادة هذه الخلايا التي تحتوي على الجين العلاجي إلى داخل جسم نفس المريض.

الأساسيات العامة للعلاج بالچينات General Principles of Gene Therapy

تعتمد معظم الطرق المباشرة للعلاج الچينى على اصلاح الفشل الوراثى الذى يسببه چين مفرد (Single gene) عندما تكون نسختى (Two copies) الچين غير فعالتين وظيفياً وذلك بالنسبة للأمراض الوراثية المتنحية. فإحلال نسخة جديدة وسليمة من الچين يمكنها أن تعالج هذا الفشل الوراثى وهذا ما يعرف أحياناً بالعلاج الچينى بالإحلال (Replacement gene therapy) والذى غالباً ما يشمل الأمراض الوراثية التى غالباً ما تؤثر على عضو (Organ) واحد من الجسم أو قليل من أعضاء الجسم والخطوات الأساسية للعلاج الچينى بالإحلال هى:

١- تحديد وتعيين وتوصيف الچين وهى أول خطوة فى العلاج الچينى بالإحلال حيث يجب تحديد وتعيين الچين المسئول عن الفشل الوراثى.

٢- اختيار الحامل (Vector) المناسب للچين . فمن الناحية العملية فإن معظم الحاملات التى تستخدم فى توصيل الچين إلى المرضى تتم باستخدام بلازميدات بكتيرية كحاملات للچين السليم وقد يستخدم أحياناً العلاج الچينى بطريقة مباشرة باستخدام قطعة من الـــDNA تحمل الچين العلاجى (Therapeutic gene) وهى أكثر طرق التوصيل الخاصة المستخدمة فى العلاج الچينى. وتستخدم فى معظم الحالات الأخرى الڤيروسات المتحورة كحامل للچين العلاجى. ولكن نظراً لأن بعض الڤيروسات تسبب بعض الأمراض لذلك يجب نزع أسلحتها بطريقة وراثية حتى لا تسبب أى مرض . ورغم ذلك فإن حوالى ٧٠% من محاولات العلاج الچينى فى الإنسان كانت تستخدم الڤيروسات المحوره كحاملات (Vectors) للچين العلاجى ويستخدم لهذا الغرض مجموعتين رئيسيتين من الڤيروسات هما: الادينوڤيروسات (Adenoviruses) والرتروڤيرسات (Retroviruses) .

٣- كلونة الچين العلاجى وذلك من خلال ربط (Joining) الچين العلاجى بالحامل المناسب بحيث يكون البناء المكون من الچين العلاجى أو الچين السليم والحامل مصمماً بطريقة تسمح بإظهار التعبير الچينى المناسب له بمجرد أن يتواجد فى خلايا المرضى.

٤- توصيل الچين العلاجى أو الچين السليم للمرضى ويتم ذلك بواسطة عديد من الطرق المتنوعة منها:

أ- حقن البناء المكون من الچين السليم والحامل فى مجرى الدم أو فى نسيج أخر.

ب- فى بعض الحالات تزال بعض الخلايا من المرضى ويجرى هندستها وراثياً بادخال الچين السليم وذلك بتنمية هذه الخلايا فى مزارع خلوية ثم تعاد هذه الخلايا المهندسة وراثياً والتى تحتوى على الچين السليم مرة أخرى إلى المرضى وتعرف هذه الطريقة بالعلاج الچينى خارج الخلية (Ex vivo gene therapy) وذلك لأن هندسة الچينات وراثياً تتم خارج جسم المريض.

ج- فى بعض الحالات الأخرى يتم توصيل الچين السليم والحامل الذى يحمله بطريقة مباشرة إلى المريض عن طريق الحقن المباشر داخل الأنسجة عن طريق أداة قذف (Gene gun) أو بادخاله فى الليبوسومات (Liposomes) وهذا ما يعرف بالعلاج الچينى داخل الخلية(In vivo gene therapy).

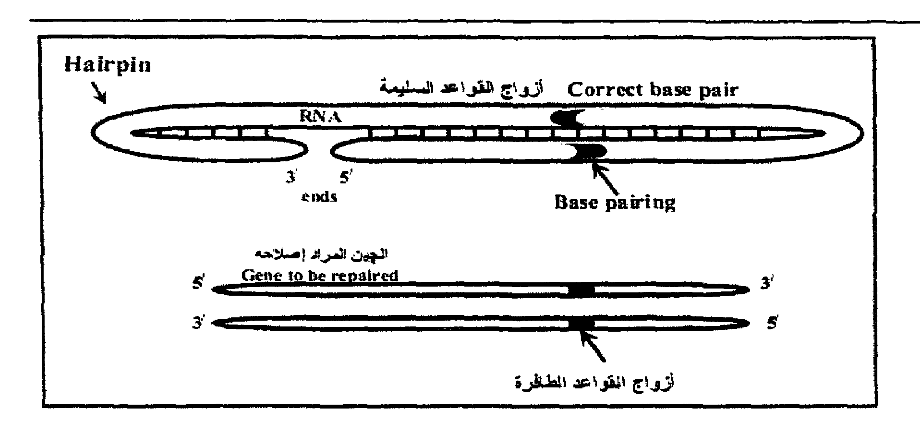
العلاج الچينى بإصلاح الچين Gene therapy by gene patching

فى العلاج الچينى بالإحلال يكون عادة فى إحلال كل الچين غير الفعال وظيفياً بنسخه (Copy) كاملة من الچين الفعال وظيفياً (الچين السليم). ومع ذلك فإن بعض الچينات غير الفعالة وظيفياً يرجع إلى احتوائها على تغير فى نيوكليوتيده واحدة عن الچين الطبيعى والفعال وظيفياً، ففى مثل هذه الحاله فإنه يمكن اصلاح (Patched) هذا الچين بدلاً من إحلاله بچين فعال وظيفياً كاملاً. ويمكن أن يجرى هذا الإصلاح للچين عن طريق حدوث العبور (Crossing over) بين قطعة الچين صغيرة من الـــDNA عديدة النيوكليوتيدات السليمة بتلك النيوكليوتيدات المتغيرة أو المتحورة فى غير الفعال وظيفياً. ويجب أن تكون تلك القطعة الصغيرة من الـــDNA التى تستخدم فى الإحلال والتى تحتوى على النيوكليوتيدات السليمة طرفيها ملتويان (Hairpen) لحمايتهما ومنع تكسيرهما بواسطة إنزيمات (Exonucleases) ولكن هذه الطريقة مازالت فى مراحلها التجريبية (شكل ٨٩).

الادينوڤيروسات كحاملات فى العلاج بالچينات

Adenovirus vectors in Gene Therapy

الادينوڤيرس (Adenovirus) هو ڤيرس بسيط نسبياً مادته الوراثية عبارة عن جزىء مزدوج الخيط من الـــDNA فى صورة خطية أو طولية ويحتوى على حوالى ٣٦٠٠٠ زوج من النيوكليوتيدات وينتهى طرفى الـــDNA ببروتين طرفى لحماية طرفى الـــDNA ويهاجم هذا الڤيرس خلايا الإنسان والفقاريات الأخرى.

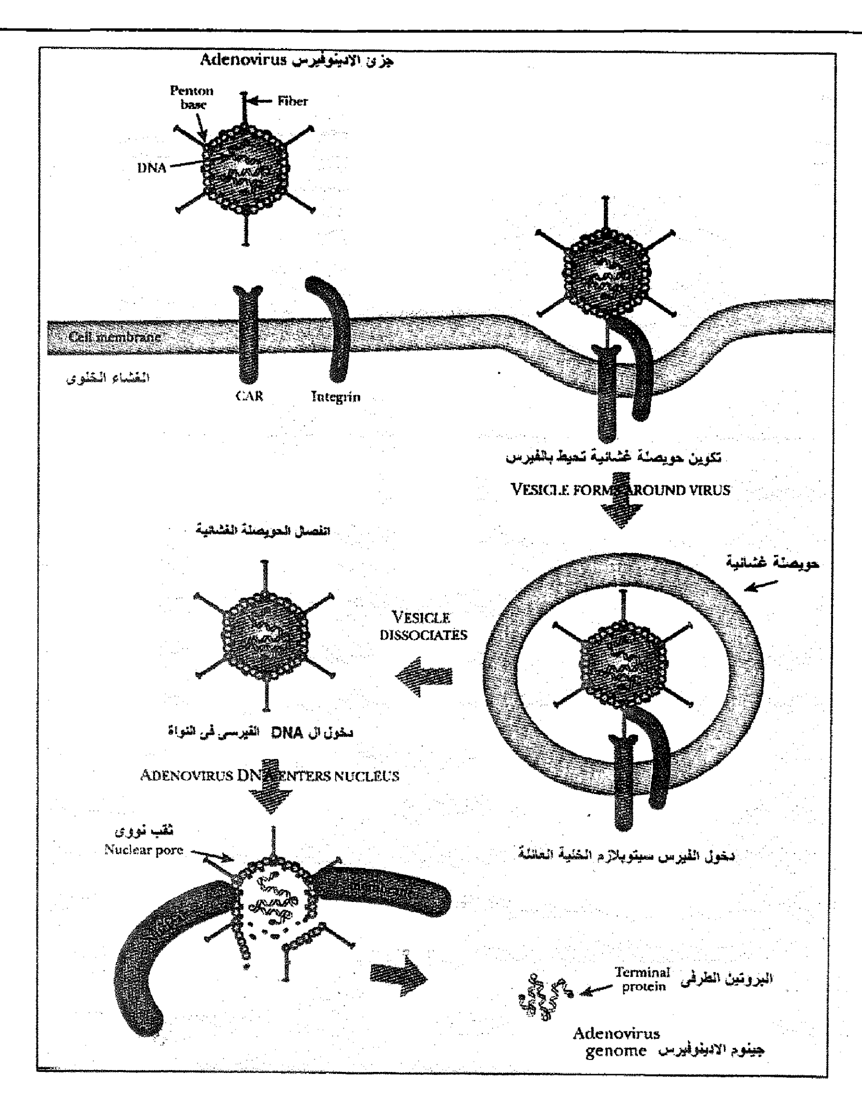


شكل (٨٩) : إصلاح الجين الطافر بإحلال النيوكليوتيدات السليمة أو الطبيعية محل تلك الطافرة أو المتغيرة بواسطة حدوث العبور (Crossing over) بين النيوكليوتيدات السليمة والطافرة فى الجين الطافر.

ويتركب الجزىء الڤيرسى من غلاف بروتينى معقد التركيب يحتوى بداخله على جزىء الـــDNA المزدوج الخيط ، كما يحتوى الجزيء الڤيرس على ألياف (Fibers) بروتينية والتى ترتبط بسطح الخلية العائلة عند مواقع استقبال خاصة على سطح الخلية العائلة حيث ترتبط قمة هذه الألياف عند مواقع الاستقبال فى الخلية العائلة (شكل ٩٠).

ويتم دخول جزيء الڤيرس بالكامل إلى الخلايا العائلة عن طريق التعرف على كلاً من المستقبلين Integrin , CAR وبعد ذلك يحقن الڤيرس مادته الوراثية (DNA) داخل النواة من خلال ثقب فى الغلاف النووى (شكل ٩٠). ولقد كانت الادينوڤيروسات أول الڤيروسات التى اختيرت كحاملات (Vectors) للاستخدام فى العلاج الجينى فى الإنسان وذلك للأسباب التالية:

١- أنها أقل ضرراً.
٢- أنها غير مسرطنة بمعنى أنها لا تسبب أوراماً سرطانية .
٣- من السهل تنميتها نسبياً ويمكنها أن تنتج كميات كبيرة من الڤيروسات الجديدة.
٤- دورة حياتها (Life cycle) معروفة تماماً.
٥- وظيفة معظم چيناتها معروفة.
٦- التتابع النيوكليوتيدى الكامل لها متاحاً ومعروفاً.



شكل(٩٠): خطوات دخول الادينوفيرس (Adenovirus) الخلايا الحيوانية عن طريق التعرف على المستقبلين CAR والـــIntegrin الموجودين على الغلاف الخلوى للخلية الحيوانية حيث يتم دخول الفيرس إلى الخلية عن طريق حويصلة غشائية تحيط بالفيرس والتى تنفصل عن الفيرس فى السيتوبلازم. ويقوم الفيرس بحقن الـــDNA الخاص به فى النواة من خلال ثقب فى الغلاف النووى.

والعدوى البسيطة بهذه الڤيروسات تسبب بعض الألتهابات إلا أنها قد تسبب بعض الأمراض الخطيرة فى الأفراد التى نظامها المناعى مصاب أو ضعيف. وعلى ذلك عند تصميم هذه الڤيروسات لاستخدامها كحاملات لچينات العلاج الچينى فإنه يجب نزع هذه الڤيروسات من أسلحتها وذلك بشل نظام تضاعفها بإزالة الچين الذى ينتج بروتين (E1A) وهو البروتين الڤيرس الذى يتكون فور حدوث العدوى بالڤيرس وهذا البروتين يقوم بوظيفتين:

١- يعزز نسخ چينات الڤيرس الأخرى.

٢- أنه يرتبط ببروتين الخلية العائلة (Rb) والذى يمنع الخلية بصورة طبيعيه من الدخول فى مرحلة تضاعف الــDNA (S-phase) وبالتالى يحث الخلية العائلة فى إظهار التعبير الچينى للچينات اللازمة لتخليق الــDNA والتى يستخدمها الڤيرس لتضاعفه الذاتي. ويتم الحصول على جزيئات الڤيرس المشلولة معملياً بتنميتها على خلايا عائله معدلة چينياً تحتوى على الچين الڤيرسى E1A مدموجاً فى الــDNA للخلية العائلة. وجزيئات الڤيرس الناتجة بواسطة هذه الطريقة لا يمكنها أن تتضاعف أو تتكاثر داخل الخلايا الحيوانية الطبيعية.

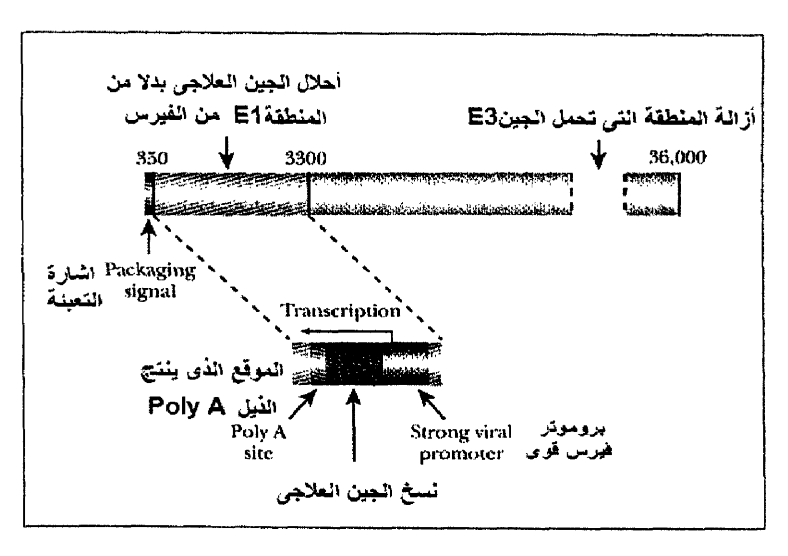
ويجب أن يكون طول جزيء الــDNA فى الڤيرس المعدل چينياً يماثل طول الطراز البرى (Wild-type) من هذا الڤيرس حيث أنه إذا كان طول جزيء الــDNA فى الڤيرس المعدل چينياً أطول أو أقصر بمقدار ٥% من طول الــDNA فى الطراز البرى تفشل عملية تكوين جزيئات الڤيرس الكاملة الجديدة.

ونظراً لأن عملية ادخال الچين العلاجى فى الــDNA الڤيرس قد تجعله أطول من الطرز البرى عن طريق إحلاله بدلاً من الچينات التى تسبب شل تضاعف الڤيرس فإنه تفشل عملية تكوين جزيئات ڤيرسية كاملة ولكن إزالة بعض الأجزاء من الــDNA الڤيرسية غير الضرورية قد تحل هذه المشكلة (شكل ٩١) وعلى الرغم من أن الچينات التى تحملها هذه الڤيروسات المهندسة چينياً يحدث لها تعبير چينى بنجاح فى الأنسجة الحيوانية إلا أن هناك بعض المشاكل منها:

١. المشكلة الرئيسية هى أن العدوى الڤيرسية تستمر لفترة قصيرة وعلى ذلك فإن التعبير الچينى للچينى يظهر لعدد قليل من الأسابيع فقط قبل أن يقوم النظام المناعى للكائن بإزالة الڤيرس.

٢. أن المرضى الذين تكونت لديهم مناعة ضد القيرس العلاجى فإن العدوى الثانية بنفس القيرس المهندس چينياً سوف تفشل وعلى ذلك فإن أستخدام هذه القيروسات المعدلة چينياً كحاملات للچينات فى العلاج الچينى لا يمكن استخدامها على المدى الطويل من العلاج الچينى فى علاج الأمراض الوراثية.

وحتى فى وجود مثل هذه المشاكل فاستخدام هذه القيروسات المعدلة چينياً كحاملات (Vectors) للچينات يساعد كثيراً فى توصيل الچينات المُهلكة (Deadly genes) إلى الخلايا السرطانية حيث تكون الفترة القصيرة من التعبير الچينى للچين المُهلك كافية لتدمير الخلايا السرطانية. ونظراً لأن عديد من السرطانات (Cancers) تنتج خلاياها البروتين المستقبل CAR بمستويات عالية فإن الغالبية العظمى من العلاج بالأدينوڤيرس تكون موجهه حالياً إلى الخلايا السرطانية.



شكل (٩١): يوضح هندسة الادينوفيرس چينياً لإستخدامه فى العلاج الچينى حيث يجب أن يكون طول الـ DNA فى القيرس المعدل چينياً يماثل تماماً الـDNA الموجود فى القيرس الطبيعى والذى يحتوى على ٣٦ الف زوج من القواعد وذلك لحدوث التجميع المناسب لجزيئات القيرس الكاملة ويتم هندسة القيرس چينياً على النحو التالى:

١- إحلال الچين العلاجى (Therapeutic gene) بالمنطقة (E_1).

٢- إذا كان الچين العلاجى أكبر من منطقة (E_1) فإنه يجب إزالة المنطقة التى تحمل الچين E_3 gene وذلك للحصول أو الأحتفاظ بالطول الثابت لطول الـDNA القيرس والمعدل چينياً والذى يماثل تماماً طول الـDNA فى القيرس الطبيعى.

العلاج الچينى لتليف الرئة بواسطة الادينوفيرس

Cystic Fibrosis Gene Therapy by Adenovirus

نظراً لأن الرئه (Lung) سهلة المنال للعدوى الڤيرسية فإن تليف الرئه (Cystic fibrosis) يعتبر المرشح الأول للعلاج الچينى ، ولقد أمكن كلونة الچين الطبيعى السليم وأدخل فى ادينوڤيرس مشلول (Crippled adenovirus) ومعاملة الفئران (Rats) بالڤيرس المهندس وراثياً بالرش على الأنف والرئة ثم أجرى نفس الشيء بعد ذلك على الإنسان. ولقد وجد ظهور التعبير الچينى للچين السليم فى بعض الحالات وتم استعادة حركة أيون الكلوريد (Chloride ion) ولكن لسوء الحظ فشل هذا التعبير الچينى بعد فترة ٣٠ يوم وأن تكرار الجرعة من الڤيرس المعدل چينياً كان ذات تأثيرها ضعيف ويرجع ذلك أساساً على تعرف النظام المناعى على الڤيرس وتحطيمه ونأمل فى المستقبل القريب بان تحسين الحامل سوف يسمح بعلاج تليف الرئه بواسطة الرش بالأنف (Nasal sprays) بالڤيرس المهندس چينياً ، ومع ذلك يجب ملاحظة أن هذا العلاج الچينى يعالج فقط الأعراض الموجودة فى الرئة ولكنه لا يصحح الفشل الوراثى فى الخلايا التناسلية حيث يظل يورث هذا الفشل الوراثى إلى النسل.

العلاج الچينى بالرتروڤيرس Retrovirus Gene Therapy

الرتروڤيروسات (Retroviruses) هى مجموعة من الڤيروسات التى تخزن معلوماتها الوراثية فى صورة خيط من الـــRNA والذى يتحول إلى خيط مزدوج من الـــDNA داخل الخلية العائلة عند حدوث العدوى. وهذه المعلومات الوراثية (الچينات) التى أصبحت فى صورة DNA وبعد ادماجها فى چينوم (DNA) الخلية العائله تعمل مثل باقي چينات الخلية العائله من تخليق جزيئات RNA ڤيرسية جديدة وكذلك تخليق كل البروتينات اللازمة لتكوين جزيئات الغلاف البروتينى الڤيرس والتى يحدث لها تعبئه لتكوين جزيئات ڤيرسية جديدة كاملة التكوين. ويهاجم هذه المجموعة من الرتروڤيرسات العديد من طرز خلايا الثدييات ولكى تحدث العدوى الناجحة بهذا الڤيرس يجب أن تكون الخلايا العائله فى مرحلة الانقسام الخلوى حيث أن هذا الطراز من الڤيروسات لا يستطيع عدوى ومهاجمة الأنسجة التى توقفت خلاياها عن الانقسام الخلوى. ومع ذلك كانت الرتروڤيروسات متميزه فى حمل أول چين للعلاج الچينى فى الإنسان.

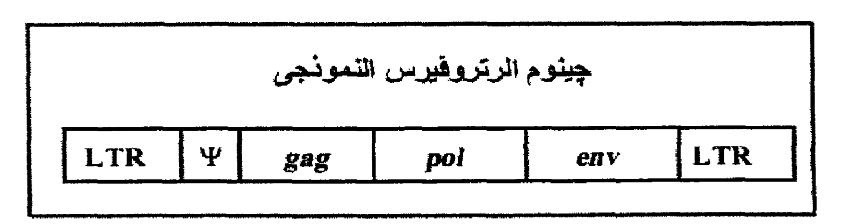
تركيب جزيئى الرتروڤيرس Structure of Retrovirus particle

يتركب جزيئى الرتروڤيرس من غلاف بروتينى مزدوج أحدهما غلاف داخلى (Capsid) يحيط بالمادة الوراثية للڤيرس (RNA) والآخر غلاف خارجى يتركب من طبقة مزدوجة من الدهون والذى يشتق من الغلاف السيتوبلازمى للخلية العائله والمادة الوراثية فى هذا الڤيرس (RNA) تتركب من ثلاثة چينات تركيبية (Structural genes) وهى (شكل ٩٢):

١- الچين gag يحمل الشفرات اللازمة للتعبير عن البروتينات التى تدخل فى تركيب الماتركس (Matrix). وكذلك الغلاف البروتينى الداخلى.

٢- الچين pol يحمل الشفرات اللازمة للتعبير عن البروتينات التى تنتج إنزيم الـــProtease وإنزيم النسخ العكسى Reverse transcriptase والذى يقوم بنشاط إنزيم البلمرة DNA polymerase ونشاط إنزيم RNase-H اى أنه إنزيم ذو نشاط مزدوج وأيضاً إنزيم Integrase.

٣- الچين env يحمل هذا الچين الشفرات اللازمة للتعبير عن البروتين الذى يدخل فى تركيب الجليكوبروتين (Glycoprotein) الذى يدخل فى بناء وتركيب مواقع الاستقبال الڤيرسية.



شكل (٩٢): الچينوم النموذجى للرتروڤيرس (Typical retrovirus genome) حيث يحتوى على إشارة تجميع جزيئات الڤيرس (ψ signal) والچينات env, pol, gag بين الطرفين المعروفين باسم LTR.

وبالاضافة للچينات التركيبية الثلاثة السابقة يحتوى الچينوم الڤيرس (RNA) على ما يلى:

أ- التتابعات النيوكليوتيدية المتكررة الطويلة والطرفية Long Terminal Repeats (LTR) والتى تقع فى كل من الطرف $3'$ والطرف $5'$ من الـــRNA الڤيرسى وهذه التتابعات النيوكليوتيدية (LTR) يحتاجها الڤيرس فى ادماج نسخه الـــDNA للڤيرس بچينوم (DNA) الخلية العائله.

ب- التتابع النيوكليوتيدى المعروف باسم ψ nucleotide sequences والمحصورة بين الچين gag والتتابعات النيوكليوتيدية (LTR) فى الطرف ′5 من الـــRNA والتى تعطى الاشارة اللازمة لتعبئة جزيئات الـــRNA الڤيرسية والبروتينات الڤيرسية التى يتركب منها الغلاف البروتينى الڤيرس لتكوين جزيئات ڤيرسية جديدة كامله.وتتلخص دورة تكاثر (Life cycle) هذا الڤيرس (Retrovirus) داخل الخلية العائله فى الخطوات التالية:

١) تبدأ دورة التكاثر بارتباط الڤيرس الكامل بالخلية العائله عن طريق مواقع الاستقبال الموجودة على سطح الخلية العائله وتلك الموجودة على الغلاف الخارجى للڤيرس والتى من خلالها يدفع الڤيرس مادته الوراثية (RNA) والمحاطة بالغلاف الڤيرسى الداخلى داخل الخلية العائله.

٢) يحدث النسخ العكسى (Reverse transcription) لخيط الـــRNA الڤيرس بواسطة إنزيم النسخ العكسى الڤيرسى وتكوين خيط مفرد من الـــRNA والذى يتحول إلى جزىء من الـــDNA مزدوج الخيط بواسطة نفس الإنزيم.

٣) يقوم إنزيم الـــIntegrase بادماج الـــDNA الڤيرسى الناتج داخل چينوم (DNA) الخليه العائله.

٤) تقوم الچينات الڤيرسية التى تم إدماجها فى DNA الخلية العائله باستخدام كل مكونات الخلية العائله التى تتطلبها عمليات إنتاج جزيئات من الـــRNA الڤيرسية الجديدة وكذلك البروتينات الڤيرسية المختلفة التى تدخل فى تركيب الأغلفة الڤيرسية وكذلك تلك التى تدخل فى تركيب مواقع الأستقبال الڤيرسية وبالتالى يتم إنتاج كل هذه المكونات داخل الخلية العائله والتى تتجمع بعد ذلك لتكوين جزيئات ڤيرسية جديدة كاملة.

٥) يحدث تبرعم (Budding) فى جزء من الجدار الخلوى للخلية العائله عند مواقع الاستقبال للخلية العائله وهذا التبرعم تخرج من خلاله جزيئات الڤيرس الكامله من الخليه العائله وبذلك تنتهى عملية تكاثر الڤيرس وخروج مئات من جزيئات الرتروڤيرس (Retrovirus) الجديدة.

ولقد استخدم هذا الطراز من الرتروڤيرس (Retrovirus) كحاملات للچين العلاجى حيث كانت متميزة فى حمل أول چين استخدم فى العلاج الچينى بنجاح فى الإنسان. وعند استخدام هذا الطراز من الڤيروسات كحامل للچين العلاجى فإنه يجب نزع السلاح الذى تستخدمه فى تكاثره داخل الخلية العائله وهى الچينات التركيبية (Structural genes) الڤيرسية الثلاثة السابقة الذكر وإحلالها بالچين المكلون (Cloned gene) (شكل ٩٣) أو الچين العلاجى وبالتالى فإنها لا

تستطيع أن تتكاثر داخل الخلية العائلة وتعرف مثل هذه الڤيروسات باسم الڤيروسات المعدلة چينياً والتى يجب أن تحتوى على التتابع النيوكليوتيدى الذى ينتج إشارة التعبئه وهو التتابع النيوكليوتيدى ψ وكذلك على التتابعات النيوكليوتيده المتكررة الطويلة (LTR) فى كل من الطرف $5'$ والطرف $3'$ من خيط الـــRNA الڤيرس. وهذا الطراز من الڤيروسات والمعدلة چينياً يمكنها أن تحمل ما بين ٦٠٠٠ إلى ٨٠٠٠ زوج من القواعد والتى يتم إدخالها فى الچينوم الڤيرس المعدل چينياً. ويقود البروموتور الڤيرس بالطرف $5'$ LTA التعبير الچينى للچين المكلون (Cloned gene) أو الچين المنقول (T.G.).

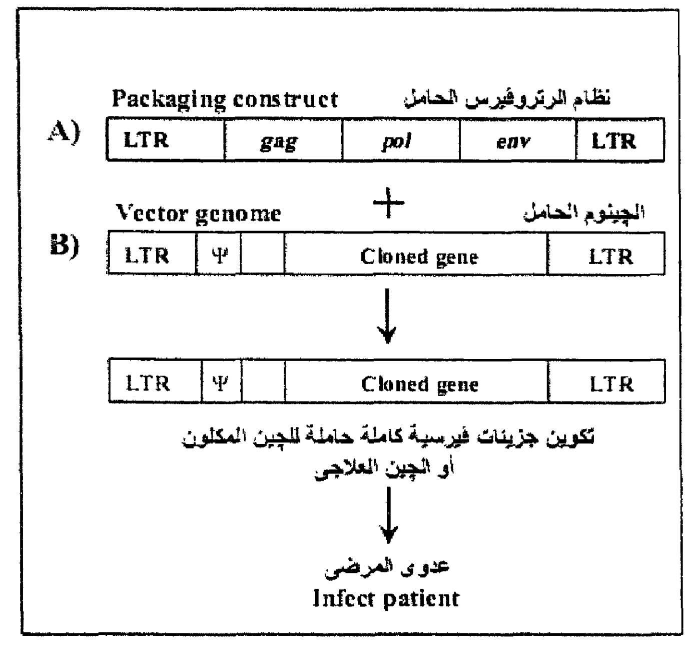
وبعد حدوث العدوى بهذا الڤيرس المعدل چينياً فإن الـــRNA الموجود داخله يحدث له نسخ عكسى لتكوين نسخه من الـــDNA على الرغم من أن هذا الحامل الڤيرس لا يحمل نسخه من الچين الذى ينتج إنزيم النسخ العكسى إلا أن قليل من حزيئات هذا الإنزيم تكون موجودة فى جزيئات الڤيرس. والصورة النموذجية لإستخدام الرتروڤيرس كحامل للچين العلاجى هى إحلال الچين المكلون (Cloned gene) محل الچينات التركيبية الثلاثة gag و pol و env ثم بعد ذلك إدماج هذا الرتروڤيرس المعدل چينياً داخل الـــDNA للخلية العائلة.

والصورة النموذجية لإكثار هذا الطراز من الڤيروسات لإستخدامها كحاملات للچين العلاجى (الچين المنقول) تكون باستخدام طرازين مختلفين من هذا الرتروڤيرس فى عدوى الخلايا العائلة هما (شكل ٩٣):

١ – الڤيرس الحامل للچين العلاجى (Therapeutic vector) والذى يحمل الچين المكلون Cloned gene (الچين العلاجى) بدلاً من الچينات الثلاثة env, pol, gag.

٢ – الڤيرس اللازم لتعبئة جزيئات كاملة ويسمى باسم (Packing construct) والذى يحدث له إدماج داخل DNA الخلية المنتجة ويحتوى على الچينات الثلاثة env, pol, gag ولكنه لا يحتوى على إشارة تعبئة الجزيئات الڤيرسية (ψ signal) وبالتالى فإنه لا يستطيع تعبئة نفسه وتكوين جزيئات ڤيرسية كامله من الڤيرس وعلى ذلك فإن جزيئات الرتروڤيرس الناتجة سوف تتكون فقط من الرتروڤيرس الحامل للچين المكلون أو الچين العلاجى. وعندما يوجد كلا الطرازين من الڤيروسات السابقة داخل الخلية العائلة فإنه يحدث تجميع لجزيئات ڤيرسية كامله معدلة چينياً

يمكن استخدامها فى العلاج الچينى للحالة المرضية (شكل ٩٣). ونظراً لأن هذا الطراز من الڤيروسات والتى تستخدم كحاملات للچين المنقول (T.G.) أو الچين العلاجى تكون خالية تماماً من الچينات التى تنتج البروتينات الڤيرسية فإنها لا تسبب حدوث استجابة مناعية وبذلك لا تسبب إلتهابات معنوية للأفراد المرضى كما أنها تمتاز بمقدرتها على الاندماج داخل الـــ DNA للخلية العائلة وبذلك فإن الچين المستخدم فى العلاج الچينى والذى يحمله هذا الطراز من الڤيروسات سوف يصبح جزء ثابت ومستديم من كروموسومات الخلية العائلة.



شكل (٩٣): النظام المستخدم لإكثار الرتروڤيرس الحامل للچين المكلون أو الچين العلاجى والذى يتركب من:

A- رتروڤيرس ناقص يحتوى على كل الچينات ماعدا إشارة التعبئة (ψ) ويعرف ببناء التعبئة (Packaging construct) والذى يحدث له إدماج فى چينوم (DNA) الخلية المنتجة (Producer cell).

B- رتروڤيرس يحمل الچين المكلون (Cloned gene) بدلاً من الچينات التركيبية الثلاثة env, pol, gag وتعرف باسم چينوم الحامل (Vector genome) للچين المكلون.

وعندما يتواجد كلاً من الطرازين من الرتروڤيرس داخل الخلية العائلة سوف تتكون جزيئات ڤيرسية كاملة معدلة چينياً تحتوى على الچين المكلون (Cloned gene) تستخدم فى الأغراض العلاجية.

العلاج الچينى بالرتروڤيرس لعلاج مرض نقص المناعة القاسية

Retrovirus Gene Therapy for SCID

ينتج مرض نقص المناعة القاسية Severe Combined Immuno Deficiency (SCID) عندما تصبح كلاً من الخلايا المناعية من الطراز بيتا (β cell) والطراز التائى (T cells) غير فعالة وظيفياً، وغالباً ما ينتج عن ذلك نقص كامل للإستجابة المناعية. وتوضع الأطفال المرضى بهذا المرض (SCID) داخل غرف خاصة معقمة ومثل هؤلاء الأطفال المرضى تكون معرضة للهلاك أو الموت إذا لم يجرى حمايتهم مناعياً ضد أى مرض. وحوالى ٢٥% من حالات نقص المناعة القاسية (SCID) ترجع إلى حدوث طفرة فى الچين (Ada gene) والذى ينتج إنزيم Adenosine deaminase والضرورى لميتابوليزم القواعد البيورينيه وأن غياب هذا الإنزيم يمنع تكوين خلايا الدم البيضاء وكذلك الخلايا المناعية من الطرز بيتا (β cells) والطراز التائى (T cells) والخلايا التى تتأثر بمرض نقص المناعة القاسية (SCID) هى الخلايا الليمفاوية (Lymphocytes) الموجودة فى مجرى الدم (الأوعية الدموية) التى تنتج الخلايا المناعية بواسطة الانقسام الخلوى لخلايا النخاع.

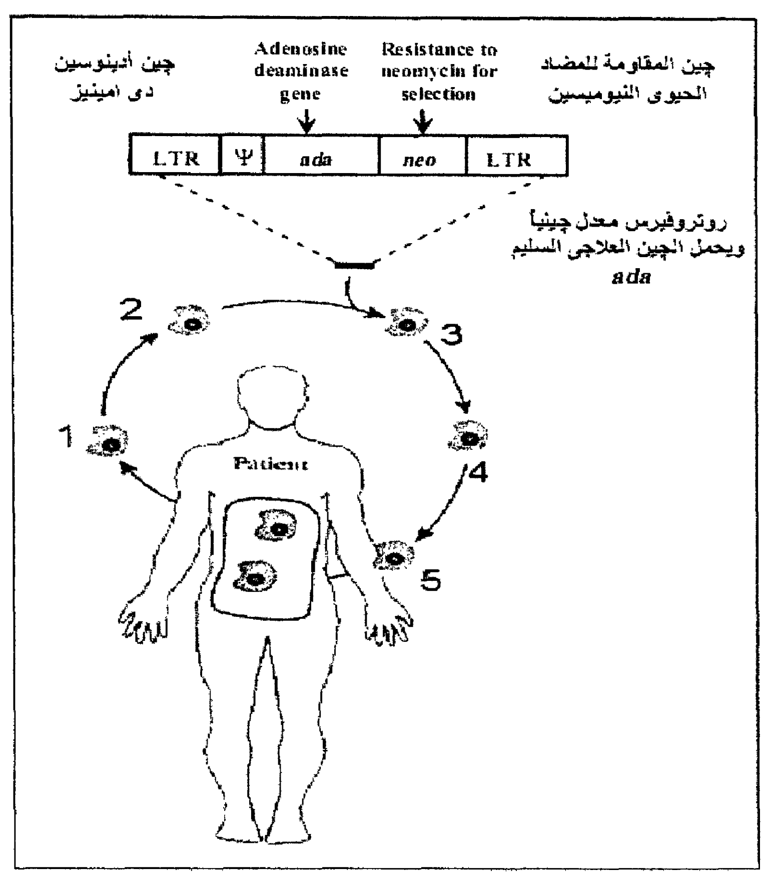
وأول محاولة ناجحة للعلاج الچينى فى الإنسان باستخدام الرتروڤيرس (Retrovirus) كحامل للچين السليم أو الچين العلاجى كانت بإمداد الطفل المصاب بمرض نقص المناعة القاسية (SCID) بنسخه من الچين السليم Ada gene على النحو التالى (شكل٩٤).

١. تجهيز أو تصميم الرتروڤيرس المستخدم كحامل للچين السليم وهو الچين Ada gene وكذلك بالچين المخبر (R.G.) وهو فى هذه الحاله چين المقاومة للمضاد الحيوى النيوميسين (Neomycin).
٢. عزل خلايا النخاع (Bone-marrow cells) من الأفراد المرضى وتنميتها على بيئة لزراعة الخلايا.
٣. إضافة الرتروڤيرس (Retrovirus) الذى يحمل الچين العلاجى أو الچين السليم Ada gene وكذلك الچين المخبر (R.G.) إلى هذه المزرعة الخلوية. وحدوث التحول الوراثى لبعض الخلايا النامية بحصولها على الرتروڤيرس الذى يحمل الچين العلاجى أو الچين السليم.

٤. إضافة المضاد الحيوى النيوميسين (Neomycin) إلى هذه المزرعة الخلوية والذى يؤدى إلى قتل الخلايا النامية التى لم يحدث لها تحول وراثى أى التى لم تحصل إلى الچين السليم بينما تظل الخلايا التى تحولت وراثياً بالرتروڤيرس الذى يحمل الچين السليم .

٥. إنتخاب الخلايا التى حدث لها التحول الوراثى بحصولها على الچين السليم.

٦. توصيل هذه الخلايا المعدلة چينياً بالچين العلاجى أو الچين السليم مرة أخرى إلى جسم المرضى عن طريق الدم.



شكل (٩٤) : خطوات العلاج الچينى لمرض نقص المناعة القاسية (SCID) بواسطة الرتروڤيرس

١-عزل الخلايا من النخاع

٢-تنمية الخلايا المعزولة من النخاع على البيئة الغذائية وإضافة الرترڤيرس المعاد توليفه والذى يحتوى على چين Adenosine deaminase gene وچين المقاومة للمضاد الحيوى نيوميسين والتتابعات الطرفية (LTR).

٣- حدوث التحول الوراثى بالرتروڤيرس الذى يحمل الچين السليم الذى يقوم بالوظيفة الطبيعية.

٤- انتخاب الخلايا المتحولة وراثياً.

٥-إعادة هذه الخلايا مرة أخرى إلى جسم المريض عن طريق الدم.

وفى عام ١٩٩١ تم معاملة عديد من الأطفال المرضى بمرض نقص المناعية القاسية (SCID) بهذه الطريقة ولكن نظراً لأن الخلايا المناعية التائية (T cells) تعيش لفترة ما بين ٦ إلى ١٢ شهر فقط فإنه يجب تكرار هذه الطريقة من العلاج الچينى السابقة على فترات متعددة ، ومع ذلك فقد أمكن حل هذه المشكلة باستخدام خلايا الدم الجذعية (Blood stem cells) والتى تنقسم لتعطى كل طرز خلايا الدم بما فيها الخلايا المناعية كما أنها تعطى أيضاً خلايا جذعية جديدة ونظراً لقلة الخلايا الجذعية إلا أن الحبل السرى يحتوى على نسبة كبيرة من الخلايا الجذعية. وفى عام ١٩٩٣ تم الحصول على خلايا الدم الجذعية من الحبل السرى من عديد من الأطفال حديثى الولادة والمعروف انهم متماثلين (Homozygous) وراثياً بالنسبة للچين الطافر (Ada gene) ولقد تم إدخال الچين السليم (Ada gene) فى الرتروڤيرس كحامل إلى خلايا الدم الجذعية والذى أدى إلى تكوين الخلايا المناعية من الطراز التائى (T cells) لفترة طويلة.

الموصلات الطبيعية فى العلاج الچينى Normal Delivery In Gene Therapy

على الرغم من أن نظم التوصيل (Delivery) فى العلاج الچينى ربما تكون حوامل غير ڤيرسية والتى تورث بأمان إلا أنه أمكن تجاهلها وذلك لأن الڤيروسات أكثر فعالية فى التوصيل الچينى. ومع ذلك فإنه لسوء الحظ حدثت عديد من الأعراض المرضية باستخدام الڤيروسات كحاملات وخاصة الرتروڤيروسات (Retroviruses). وعلى الرغم من ذلك فإن ٧٥% من محاولات العلاج الچينى كانت تستخدم الڤيروسات كحاملات فى العلاج الچينى. ولقد درست عديد من الطرق البديلة وأن قليل من هذه الطرق كانت فعالة وتستخدم على نطاق واسع وهذه الحاملات (Vectors) تشمل:

١- استخدام الـــDNA العارى تماماً من البروتينات. فعديد من الخلايا الحيوانية يمكن تحولها وراثياً مباشرة باستخدام الـــDNA النقى. ولقد وجد أن حوالى ما بين ١٠% إلى ٢٠% من محاولات العلاج الچينى كانت تستخدم الـــDNA العارى من البروتينات كحاملات للچين العلاجى.

٢- استخدام أداة قذف الچين (Particle bombardment) وفى هذه الطريقة يدفع الـــDNA الذى يحمل الچين العلاجى خلال الجدر الخلوية وكذلك الأغشية الخلوية محمولاً على جزيئات معدنية. ولقد استخدمت هذه الطريقة أساساً لدفع الـــ DNA فى الخلايا النباتية ومع ذلك فإن هذه الطريقة استخدمت للحصول على حيوانات معدلة وراثياً وأحياناً تستخدم فى الإنسان.

٣- استخدام طريقة المستقبلات الخلوية (Receptor-mediated uptake). وفى هذه الطريقة يرتبط الـــDNA أو الچين العلاجى ببروتين ما تستطيع الخلية التعرف عليه عن طريق تعرف المستقبلات الخلوية السطحية (Cell surface receptor) على هذا البروتين وعندما يدخل هذا البروتين الخلية المستقبلة يدخل معه الچين العلاجى إلى داخل الخلية المستقبلة.

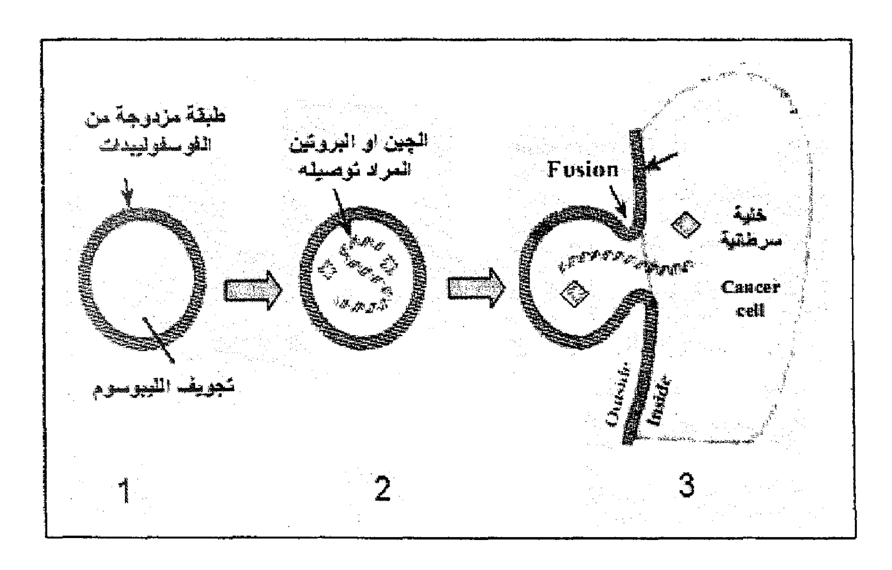
٤- استخدام طريقة الجزيئات المتعددة Polymer-complexed DNA وفى هذه الطريقة يرتبط الـــDNA أو الچين العلاجى بجزيئات متعددة polymer ذات شحنة موجبة مثل Polyethyleneimine حيث تحمل هذه الجزيئات الـــDNA المحمل بشحنة سالبة ومثل هذه الجزيئات غالباً ما تمتص بواسطة الخلايا الموجودة فى المزارع الخلوية وأنه يمكن استخدامها فى العلاج الچينى من الطراز الخارجى (Exo-vivo gene therapy) .

٥- استخدام طريقة الليبوسومات (Liposomes) وهى عبارة عن أوعية دائرية تتركب من فوسفوليبيدات (Phospholipids) ولقد تم استخدامها فى حوالى ١٠% من محلولات العلاج الچينى.

استخدام الليبوسومات فى العلاج الچينى Liposomes Gene Therapy

الليبوسومات (Liposomes) هى دوائر مجوفة ميكروسكوبية من الفوسفوليبيدات (شكل٩٥). ويمكن ملؤها بالچين العلاجى أو جزيئات أخرى وبالتالى يمكن استخدامها كحامل للچين العلاجى. وهذه الليبوسومات يمكنها أن تندمج بالأغشية المحيطة بمعظم الخلايا الحيوانية وبالتالى تدخل محتوياتها الخلية الحيوانية فى العلمية المعروفة باسم Lipofection وعلى الرغم

من أنه يمكن استخدام الليبوسومات فى العلاج الچينى بطريقة جيدة إلا أنها ليست متخصصة لخلايا معينة وذلك لأن الليبوسومات تميل للاندماج بالأغشية الخلوية لأى خلية. وتعتبر طريقة استخدام الليبوسومات فى العلاج الچينى طريقة واعدة وذلك لأنه يمكن حقنها مباشرة إلى الأنسجة المتورمة وفى الحقيقة فإن الليبوسومات أكثر استخداماً فى توصيل البروتينات للخلايا أكثر من توصيل الـــDNA أو توصيل الچين العلاجى. فعلى سبيل المثال فإن البروتينات ذات التأثير السام مثل البروتين السام Tumor Necrosis Factor (TNF) يمكن تجميعه داخل الليبوسومات وحقنها فى النسيج المتورم مباشرة حيث تندمج الليبوسومات بأغشية الخلايا السرطانية وتتحرر هذه البروتينات السامة أو المميتة من الليبوسومات إلى داخل الخلايا السرطانية.



شكل (٩٥): استخدام الليبوسوم فى توصيل البروتين العلاجى أو البروتين المضاد للنمو السرطانى:

١. الليبسوم عبارة عن دائرة مجوفة يحاط بطبقة مزدوجة من الفوسفوليبيدات.
٢. ملأ الليبوسوم بالبروتين العلاجى (أو الچين العلاجى) مثل البروتين السام TNF.
٣. يتصل الليبوسوم بالغشاء الخلوى للخية المرغوبه (الخلية السرطانية) ويحدث إندماج بينهما ويترتب على ذلك دفع الليبوسوم وما يحمله من البروتين العلاجى أو الچين العلاجى داخل الخلية السرطانية.

العلاج الچينى العدوانى للسرطان

Aggressive Gene Therapy for Cancer

على الرغم من أن معظم حالات السرطان (Cancer) لا تورث إلى النسل عن طريق الخلايا التناسلية (Germline) إلا أن السرطان هو مرض وراثى. والعلاج الچينى للمرض الوراثى يكون بإحلال الچين الطافر (الذى يسبب المرض) بچين آخر طبيعى. والعلاج الچينى للسرطان يكوت بتحطيم الخلايا السرطانية أو على الأقل تثبيط نموها ووقف انقسامها الخلوى المتتالى ومع ذلك تستخدم الطرق التالية للعلاج السرطانى:

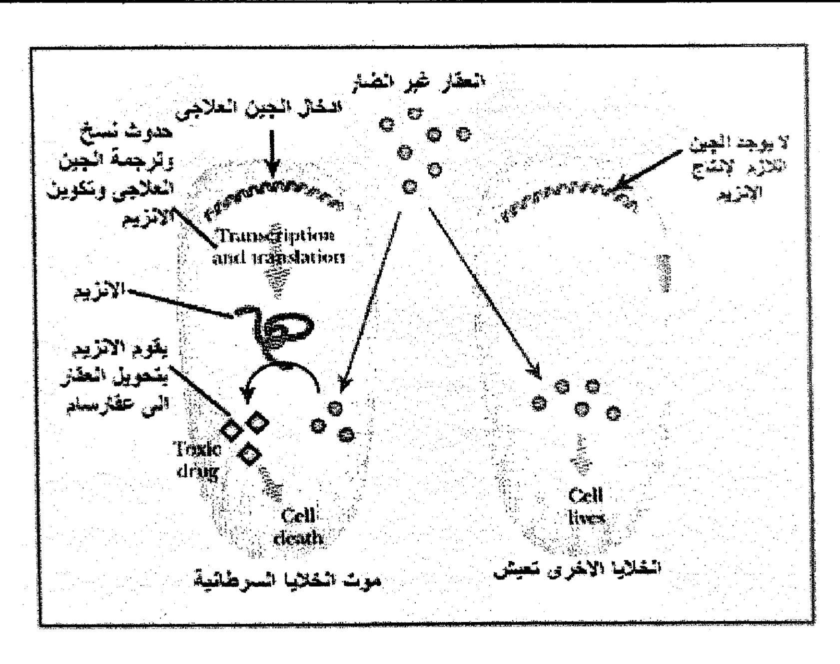
أ- إحلال الچين (Gene replacement) وفى هذه الطريقة يجرى احلال الچين الطافر الاونكوچين (Oncgene) بالچين المناظر الطبيعى او ادخال الچين الذى يثبط الورم السرطانى إلى الخلايا السرطانية ويتم ذلك من خلال تحليل الحالة السرطانية وتحديد الطفرة الچينية أو الطفرات الچينية المسئولة عن الورم السرطانى. فعلى سبيل المثال أمكن توصيل الچين الطبيعى p35 إلى الخلايا السرطانية التى تحتوى على الچين الطافر وطريقة التوصيل المستخدمة فى ذلك هى استخدام الادينوڤيرس كحامل للچين العلاجى (الچين الطبيعى) وأحياناً يستخدم الليبوسوم فى توصيل الچين العلاجى للخلايا السرطانية.

ب- المهاجمة المباشرة (Direct attack) وفى هذه الطريقة يستخدم الچين الذى يساعد فى قتل الخلايا السرطانية مثل استخدام الچين TNF الذى ينتج البروتين ذو التأثير السام Tumor Necrosis Factor (TNF) والذى ينتج البروتين بواسطة خلايا الدم البيضاء المعروفة باسم Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TIL) والتى تتسرب طبيعياً إلى الخلايا السرطانية حيث يتحرر منها البروتين السام TNF والذى يكون فعالاً بصورة مناسبة فى قتل الأورام السرطانية الصغيرة وذلك لأن مهاجمة الأورام السرطانية الكبيرة يكون من الصعب التحكم فيها والتى تتطلب زيادة إنتاج البروتين السام TNF ويحدث العلاج الچينى بهذه الطريقة على النحو التالى:

١. كلونة الچين TNF بالحامل المناسب.
٢. عزل خلايا الدم البيضاء من المرضى وتنميتها فى مزارع خلوية.
٣. إدخال نسخ عديدة من الچين TNF فى الخلايا النامية فى المزارع الخلوية.
٤. تعزيز نشاط الچين TNF بإضافة المحفزات اللازمة لزيادة نشاطه فى خلايا الدم البيضاء.
٥. انتخاب الخلايا المعدلة چينياً والتى تحمل الچين TNF وحقنها مرة ثانية فى الأفراد المرضى.

وعلى الرغم من أن البروتين السام (TNF) فعال لدرجة كبيرة فى قتل مثل هذه الخلايا السرطانية إلا أن له تأثير سام على الخلايا الأخرى غير السرطانية وبالتالى فإن المستويات العالية من هذا البروتين السام (TNF) لها تأثير خطير على الأفراد المرضى وللتغلب على ذلك يجب:

١- تحديد مستوى هذا البروتين السام (TNF) فى الخلايا المستهدفة فى داخل الورم السرطانى.
٢- استخدام الرتروڤيرس كحامل للچين الذى ينتج البروتين السام (TNF) وإضافة البروموتور المناسب لهذا الچين والذى يجرى تحفيزه بواسطة عوامل تستخدم بالفعل فى معالجة الخلايا السرطانية مثل الأشعة.



شكل (٩٦): العلاج الچينى الانتحارى (Suicide gene therapy) حيث يتم حقن الچين العلاجى فى الخلايا السرطانية والذى يقوم بإنتاج الإنزيم الإنتحارى الذى يحول العقار غير الضار (Pro-drug) إلى مركب سام داخل الخلية السرطانية وبالتالى يكون تأثير هذا الچين على الخلايا السرطانية فقط ولا يكون للعقار المستخدم أى تأثير ضار على الخلايا الأخرى غير السرطانية.

ج- العلاج الچينى الانتحارى (Suicide Gene Therapy) وفى هذه الطريقة يجرى ادخال الچين العلاجى إلى الخلايا الهدف (الخلايا السرطانية) وهذا الچين يقوم بإنتاج إنزيم يقوم بتحويل العقار (Pro-drug) غير السام المستخدم فى العلاج إلى مركب له تأثير سام داخل الخلية السرطانية (شكل٩٦). ونظراً لأن الخلايا غير السرطانية لا تحتوى على الچين الذى ينتج هذا الإنزيم والذى يعرف باسم الإنزيم الانتحارى فإنها لا تتأثر بالعقار المستخدم فى علاج السرطان. ويجرى إدخال الچين العلاجى الذى ينتج الإنزيم الانتحارى إلى الخلايا السرطانية المستهدفة عن طريق حوامل ڤيرسية معدلة چينياً لهذا الغرض أو باستخدام الليبوسومات كحامل للچين العلاجى. فإذا ظهر هذا الإنزيم بنجاح فى النسيج

المتورم فإنه سوف يتولد داخل الخلايا السرطانية المركب السام الناتج من تحويل العقار غير الضار إلى المركب ذو التأثير السام أو المميت للخلايا السرطانية وبالتالى فإنه يمكن إعطاء المرضى هذا العقار بوسائل طبيعية وبذلك يكون هذا العقار ذو تأثير مميت للخلايا السرطانية فقط.

مرض تليف الرئة Cystic fibrosis disease

مرض تليف الرئة هو أكثر الأمراض الوراثية شيوعاً في الولايات المتحدة الأمريكية والذي يضيب حوالي ٣٠٠٠٠ فرد. ويحدث هذا المرض عندما يرث الفرد الچينين الطافرين من الأبوين حيث يرث أحد الچينين من الأب والچين الآخر من الأم. والچين الطبيعي Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor (CFTR) ينتج البروتين الذي ينظم تركيز أيونات ملح الكلوريد في الخلية والأفراد المرضى بتليف الرئة تنتج فقط البروتين الطافر cftr في خلاياها مسبباً ذلك زيادة المستويات العالية من أيونات الملح مما ترتب عليه دخول الماء إلى الخلايا والذي ينتج عنه تكوين مخاط لزج في مجرى الهواء مما يصعب معه التنفس. وعلى الرغم من أن الطفرة cftr في الأفراد الأصيلة للطفرة (cftr/cftr) تؤثر على كل الخلايا في الجسم إلا أن معظم التأثير الضار يكون في خلايا الرئة. وحوالي ١٠ مليون أمريكي يحملون هذا الچين في صورة خليطة (CTFR/cftr) ولكنها لا تقاسى من أعراض هذا المرض ولكن المخاطر البيولوجية تحدث للأطفال التي ترث كلا الچينين الطافرين (cftr/cftr) وتصبح مريضة بمرض تليف الرئة مما يسبب انخفاض أعمارهم وموتهم في سن مبكرة.

ولقد بدأ العلماء بالتركيز على استخدام العلاج الچيني لتليف الرئة لكل من أنسجة الرئة وأنسجة البنكرياس. وفي اختبارات العلاج الچيني الأولية قام العلماء بأخذ خلايا من رئة وبنكرياس الأفراد المرضي وزراعتها في مزارع خلوية لزراعة الأنسجة في المعمل واستخدموا حامل ڤيرسي لإدخال الچين الطبيعي (CFTR) إلى خلايا الرئة النامية وكذلك خلايا البنكرياس النامية في مزارع خلوية لزراعة الأنسجة وكانت هذه الخلايا مأخوذة من أفراد مرضى أصيلة (cftr/cftr) للچين الطافر. وقبل إجراء العلاج الچيني كانت خلايا الرئة وكذلك خلايا البنكرياس النامية في مزارع خلوية لزراعة الأنسجة تحتوي على مستويات عالية من الملح كما هو متوقع

ولكن بعد إجراء العلاج الچيني أظهرت خلايا الرئة وخلايا البنكرياس في المزارع الخلوية التعبير الچيني للچين الطبيعي (CFTR) وكذلك البروتين الناتج منه وأظهرت كلاً من خلايا الرئة وخلايا البنكرياس النامية في مزارع خلوية انخفاض كبير في مستويات الملح داخل الخلايا المعالجة بالعلاج الچيني.

مرض الخلايا المنجلية Sickle cell disease

مرض الخلايا المنجلية هو مرض وراثي خطير والذي يصيب فرد واحد من كل ٥٠٠ من الأمريكان الأفارقة. وهذا المرض كان أول مرض وراثي في الإنسان تم اكتشافه والناتج عن حدوث الطفرة الچينية والتي ترتب عليها إحلال زوج من القواعد محل زوج آخر من چين بيتا جلوبين (β-globin) والذي ترتب عليه إحلال الحامض الأميني فالين في البروتين الطافر محل الحامض الأميني جلوتاميك عند الموقع السادس في السلسلة بيتا جلوبين. وعلى الرغم من أن هذا المرض تم اكتشافه منذ عام ١٩٥٧ إلا أن وضع طريقة للعلاج الچيني لهذا المرض مازالت محيره حتى الآن.

وتغير هذه الطفرة تركيب الهيموجلوبين وهو المكون الرئيسي في خلايا الدم الحمراء والتي تقوم بنقل الأكسچين من الرئة إلى باقي أجزاء الجسم الآخرى. ويترتب على هذا البروتين الطافر أن تتحول خلايا الدم الحمراء الدائرية إلى الشكل المنجلي والتي تسبب مرض خلايا الدم المنجلية. والأفراد المريضة بهذا المرض يظهر عليها أعراض الأنيميا لأن خلايا الدم المنجلية في الأوعية الدموية الصغيرة تغلق التدفق الطبيعي للدم في الأنسجة والأعضاء المختلفة من الجسم.وفي عام ٢٠٠١ وضع العلماء طريقة من العلاج الچيني والتي كانت ناجحة في تصحيح وعلاج مرض خلايا الدم المنجلية في الفئران مما يوصى بأن العلاج الچيني سوف يكون ناجحاً أيضاً في علاج مرض الخلايا المنجلية في الإنسان.

ولقد استخدم العلماء الحامل الڤيرسي المعروف باسم Lentiviral vector لتوصيل چين بيتا جلوبين الطبيعي إلى خلايا الفئران التي تنتج بروتين بيتا جلوبين الطافر وهذه العائلة من

Lentiviruses هي إحدى عائلات الرتروفيروسات (Retroviruses) والتي من بينها فيرس نقص المناعة في الإنسان (HIV) والذي يسبب مرض الإيدز (AIDS). ولقد أجرى التحوير الوراثي اللازم لفيرس (Lentivirus) بعناية ليكون آمن حيث لا يستطيع التكاثر داخل خلايا الإنسان ولا يسبب المرض ولكنه كان فعالاً بكفاءة في نقل الجينات إلى مدى واسع من خلايا الإنسان العائلة المختلفة وهذه العائلة من فيروسات الـ Lentiviruses هي رتروفيروسات غير عادية لأنها تستطيع عدوى الخلايا غير النشطة في الانقسام الخلوي بينما الرتروفيروسات الأخرى يمكنها أن تعدي فقط الخلايا النشطة في الانقسام الخلوي.وفي الثلاثين عام الماضية استطاعت شركات التقنية الحيوية تطوير عديد من الحاملات الجينية الفيرسية والتي أصبحت متاحة تجارياً لمساعدة العلماء الإنتاج حوامل الجينات المناسبة لاستخدامها في الأبحاث الطبية الحيوية (Biomedicine) وكذلك لمساعدة العلماء في أكثار جزيئات الـ Lentivirus الحاملة للجين العلاجي لاستخدامها في العلاج الجيني.

العلاج الإنزيمي بالإحلال Enzyme Replacement Therapy

هي طريقة بديلة للعلاج الجيني حيث أمكن علاج بعض الأمراض الوراثية بنجاح بإمداد الأفراد المرضي بالجرعات المناسبة من الإنزيم الطبيعي والسليم وهذا النوع من العلاج يعرف بالعلاج الإنزيمي بالإحلال. فعلى سبيل المثال فالمصابين بمرض نقص المناعة القاسية والتي ينقصها إنزيم Adenosine deaminase deficiency (MDA) يجرى علاجهم بإمدادهم بالإنزيم الطبيعي السليم باستخدام العقار PEG-ADA والذي تم تخليقه بربط الإنزيم الطبيعي ADA بحامل لا يحدث له ميتابوليزم وهو مركب Polyethylene glycol (PEG). وهذا العقار يمد الخلايا المريضة بالإنزيم الطبيعي والسليم والفعال وظيفياً بدون حدوث أي أعراض جانبية للمرض إلا أن هذه العقار غالي جداً وأنه يجب حقن المرضى بالعقار طول حياتهم.

الباب الثانى عشر

البيولوچيا الجزيئية للسرطان

Molecular Biology of Cancer

ما هو السرطان ؟ What is Cancer ?

السرطان هو مجموعة من الأمراض التى تتصف بعدم التحكم فى نمو خلاياها وانقسامها الخلوى مكونة خلايا غير طبيعية وانتشارها بالجسم. ويتحدد حجم الأنسجة البالغة عن طريق التوازن بين نمو الخلايا الجديدة الناتجة عن الانقسام الخلوى وعدد الخلايا التى تموت والذى يعرف بالموت الخلوى (Apoptosis).

ويعرف التوازن الطبيعى بين الانقسام الخلوى والموت الخلوى بالهوميوستاسس (Homeostasis) والذى يتم تنظيمه بصورة محكمة بواسطة الچينات التى تتحكم فى الانقسام الخلوى والموت الخلوى. وتنقسم هذه الچينات إلى مجموعتين هما:

١- البروتواونكوچينات (Proto-oncogenes) وهى الچينات التى تنتج البروتينات التى تنبه الانقسام الخلوى.

٢- الچينات المكبتة للورم (Tumor-suppressor genes) وهى الچينات التى تنتج البروتينات التى إما تبطىء دورة الخلية أو تحفز الموت الخلوى.

والطفرات التى تسبب تنشيط البروتواونكوچينات بصورة مستمرة أو تجعل الچينات المكبتة للورم غير فعاله تعمل على زيادة عدد الخلايا وبالتالى تخل من التوازن بين عدد الخلايا التى تنقسم خلوياً وعدد الخلايا التى تموت وتسمى هذه الزيادة بالهيبربلزيا (Hyperplasia) وهى أول خطوة فى نمو الورم مؤدياً ذلك إلى تكوين الورم الأولى.

وهذه الطفرات الأولية ينتج عنها نمو الورم ولكنه عادة ما تكون هذه الأورام حميدة ولا تسبب موت الكائن، ومع ذلك فإن هذه الأورام الأولية غالباً ما تكتسب طفرات إضافية عن طريق الانعزال الكروموسومى غير المناسب أو عن طريق المسرطنات (Carcinogens) الموجودة بالبيئة. والمسرطنات هى عوامل بيئية تسبب حدوث طفرات فى الـــDNA إما بحدوث الطفرات فى چينات معينة أو تغيير عدد الكروموسومات أو تركيبها والتى تؤثر على الانقسام الخلوى مما يؤدى إلى تقدم الورم السرطانى والذى يختلف من خلية لأخرى داخل الورم وحيث أن معظم الخلايا تموت نتيجة لهذه الطفرات فإن عدد قليل من الخلايا تكتسب المقدرة على الهروب من هذا الورم الأولى وتستقر فى مواقع متباعدة. وهذه العملية من هجرة الخلايا تعرف باسم ميتاستاسس (Metastasis) وإذا اكتسبت هذه الخلايا السرطانية المقدرة على مهاجمة الأنسجة السليمة فيعرف السرطان فى هذه الحالة بإسم الورم الخبيث (Malignant) ويصبح المرض مهدداً للحياة.

ويظل السرطان من أحد الأمراض المخيفة فى العالم ففى الولايات المتحدة يظهر سنوياً أكثر من مليون حاله سرطان جديدة وكذلك يحدث موت لحوالى ٥ مليون فرد سنوياً بسبب السرطان. وأكثر طرز السرطان شيوعاً وانتشاراً فى الولايات المتحدة هو سرطان البروستاتا فى الذكور وسرطان الثدى فى الإناث. وفى كلا الطرازين من السرطان فإن التحديد المبكر يسمح باجراء عديد من المعاملات الفعالة فى ازالة الورم السرطانى. وعلى العكس من ذلك فإن الطرز الأخرى من السرطان مثل سرطان البنكرياس أو سرطان الرئه مازال علاجها محدوداً وأكثرها سبباً فى حدوث الموت السريع.

وعادة لا يورث السرطان داخل العائله ولكن القابلية للنمو السرطانى يمكنها أن تورث فى بعض حالات السرطان وعادة ما يحتاج النمو السرطانى إلى تجميع عديد من الطفرات الجسمية (Somatic mutations) التى يتكون بعضها تلقائياً والبعض الآخر تستحدث عن طريق العوامل البيئية مثل أشعة X (X-rays) والأشعة فوق البنفسجية.

المسرطنات Carcinogens

أقل من ١٥% من الأورام فى الإنسان هى أورام وراثية أو أمراض عائلية. وعلى الرغم من أن الأفراد التى تاريخها العائلى بالنسبة للسرطان لديها القابلية للإصابة بالسرطان أو أكثر تعرضاً للنمو السرطانى عن باقى العشيرة فإن ليس كل أفراد العائلة يحدث بها النمو السرطانى. وعلى العكس من ذلك فإن أكثر من ٩٠% من حالات الأورام السرطانية فى الإنسان تنشأ تلقائياً.

ومعظم هذه المسرطنات الطبيعية الموجودة من تلوث الهواء مثل دخان السجائر وتلوث الغذاء والذى غالباً ما يكون بسبب ناتج عملية طهى الطعام، ونسبة صغيرة من هذه الأورام التلقائية تكون ايضاً نتيجة للطفرات التى تنشأ أثناء التضاعف الطبيعى للـــDNA وعمليات اصلاح (Repair) الـــDNA وكذلك بواسطة الضرر الذى يحدث للـــDNA أو بسبب العدوى الڤيرسية و لقد قدر ان جسم الإنسان يخضع إلى حوالى ١٠٠٠٠ حالة ضرر (Lesions) لكل يوم والتى عادة ما يحدث لها اعادة اصلاح وعندما لا يحدث اعادة اصلاح لهذه الطفرات تتزايد خطورة النمو السرطانى. وتنقسم المسرطنات إلى ما يلى:

١ – **المسرطنات الكيميائية** **Chemical Carcinogens**

تقع المسرطنات الكليميائية فى ثلاثة أقسام عامة وهى:

1-Alkylating agents
2-Aralkylating agents
3-Arylhydroxylamines

وهذه المركبات الكيميائية إما أنها تتفاعل بصورة حقيقية مع الـــDNA أو يحدث لها ميتابولزم داخل الجسم والتى تتفاعل مع الذرات الحاملة للالكترونات فى نيوكليوتيدات الـــDNA خصوصاً فى ذرات النيتروچين الحلقية وذرات الاكسيچين لتكوين نيوكليوتيدات متحورة بصورة دائمة تعرف باسم DNA adducts .

ومعظم هذه المسرطنات تمتص خلال الرئه والأمعاء وتهاجر خلال الجهاز الدورى والجهاز الليمفاوى إلى الكبد حيث يحدث لها ميتابولزم بواسطة مجموعة من الإنزيمات تعرف باسم P540 mixed function oxidases وهذه الإنزيمات هى أحد أعضاء عائلة السيتوكروم Cytochrome P450(CYP). ولسوء الحظ فإن ميتابولزم هذه المسرطنات يجعل المسرطنات المباشرة أكثر وصولاً للدخول فى الخلايا الهدف وفيها يحدث لها ميتابولزم آخر عن طريق إنزيمات السيتوكروم (CYA) الخاصة بالنسيج لتصبح فى النهاية مسرطنات أقوى وأنشط. وهذا المسرطن النهائى يكون روابط تعاونية مع نيوكليوتيدات الـــDNA مسبباً تخليق تحورات دائمة فى الـــDNA.

وتفاعل هذه الإنزيمات لإنتاج المسرطن النهائى يوضح لماذا أنه بالإضافة لحدوث سرطان الرئه فإن التدخين يزيد من خطر السرطانات الأخرى مثل سرطان الثدى والبروستاتا.

وتنتقل المسرطنات المباشرة الناتجة عن التدخين من الكبد إلى الانسجة الهدف حيث يحدث لها هناك التحول إلى المسرطن النهائي.

ويؤدى التحور الدائم فى الـــDNA الناتج عن هذه المسرطنات إلى تحوير التركيب الثانوى للـــDNA بصورة معنوية نتيجة لحدوث الاقتران الشاذ بين أزواج القواعد. وتختلف طبيعة التحور الدائم فى الـــDNA تبعاً لنوع المادة المسرطنة فقد يكون كبيراً جداً أو تحور دائم بسيط باضافة مجموعة ميثايل مفردة للـــDNA.

وهذه التحورات الدائمة فى الـــDNA يتعرف عليها إنزيمات اصلاح الـــDNA حيث تتوم هذه الإنزيمات بأستئصال هذه التحورات من الـــDNA قبل حدوث تضاعف الـــDNA. ومع ذلك فاذا لم يحدث اصلاح للتحور الدائم فى الـــDNA فإن إنزيم بلمرة الـــDNA (DNA polymerase) يقرأ هذه النيوكليوتيدات المتحورة ويضع النيوكليوتيده غير الصحيحة فى خيط الـــDNA الجديد. وفى معظم الحالات ينتج عن ذلك طفرات تشمل زوج من النيوكليوتيدات تعرف بالطفرات الموضعية (Point mutations) والتى تورث إلى الخلايا الشقيقة بعد الانقسام الخلوى.

ويعتمد تأثير الطفرة الموضعية على مكان حدوثها فى الـــDNA . ومن حسن الحظ أن معظم هذه الطفرات الموضعية لا تؤثر على الشكل المظهرى (Phenotype) للخلية بسبب حدوثها فى مناطق الانترونات (Introns) من الجينات أو حدوثها فى القاعدة الثالثة من الشفرة والذى ينشأ عنه تكوين شفرة أخرى لنفس الحامض الأمينى (المرادفات فى الشفرة الوراثية) وبالتالى لا يحدث احلال أو تغيير للحامض الأمينى رغم حدوث الطفرة . ومن ناحية أخرى فإن الطفرات الموضعية التى تحدث فى الاكزونات (Exons) من الجينات تؤثر على تتابع الاحماض الامينية فى البروتين ويترتب على ذلك تكوين بروتين طافر. فاذا كان هذا البروتين هو أحد البروتينات التى تنظم الانقسام الميتوزى (Mitosis) أو الموت الخلوى (Apoptosis) فسوف يحدث زيادة فى عدد الخلايا وينتج عن ذلك تكوين الورم الاولى الذى يعرف بالهيبربلزيا (Hypersplasia).

٢- المسرطنات البيئية Environmental carcinogens

عديد من المسرطنات وليس كلها يتم تخليقها بواسطة الإنسان ويزيد التعرض للمسرطنات البيئية من مدى حدوث عديد من انواع السرطانات المختلفة. فعلى سبيل المثال يحفز المركب

الكيميائى Benzo (a) pyrene (وهذا المركب وجد فى دخان السجائر) زيادة مخاطر سرطان الرئه كذلك فإن التعرض لهذا المركب الكيميائى يزيد من مخاطر سرطان الثدى وسرطان البروستاتا ويرجع ٣٠% من حالات السرطان المميتة فى الإنسان إلى دخان السجائر وبذلك يعتبر من أكثر المسرطنات الهامة فى البيئة.

وبعض المركبات الكيميائية الطبيعية تسبب تحورات دائمة فى الــDNA ومنها على سبيل المثال مركب افلاتوكسين Aflatoxin BI) B1) والذى يعتبر ناتج طبيعى ينتجة فطر العفن *Aspergillus flavas* والذى يلوث الحبوب والخضروات والجوز فى عديد من مناطق العالم خصوصاً فى جنوب شرق آسيا وأفريقيا الوسطى ويحدث لمركب افلاتوكسين ميتابولزم بواسطة ثلاثة إنزيمات من إنزيمات السيتوكروم (CYP) على الأقل ويسبب هذا المركب تحورات فى الــDNA بسبب تفاعله بالنيتروچين رقم ٧ فى قاعدة الجوانين مكوناً مركب

8, 9 Dihydro-8-(N7.-deoxyguanyl)-9-Hydroxyaflatoxin BI

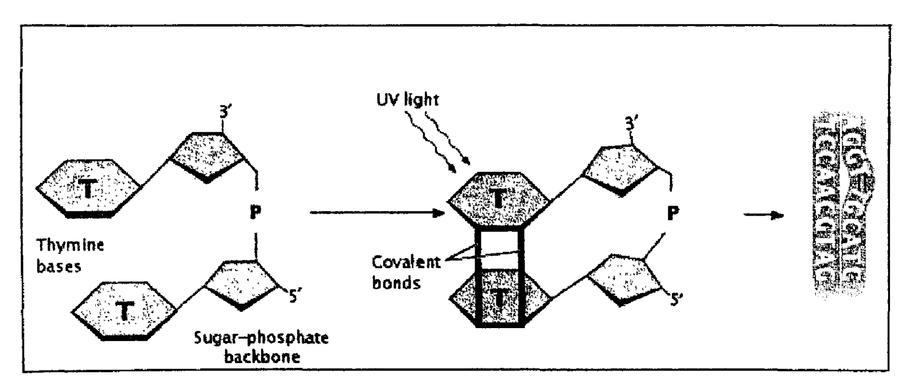
والذى يؤدى إلى سرطان الكبد. ولقد اتضح أيضاً أن استهلاك اللحوم الحمراء والدهون الحيوانية لها دور فى تكوين طرز معينة من السرطانات مثل سرطان القولون والثدى والبروستاتا ولكن ليس واضحاً تماماً كيف تؤدى هذه الأغذية إلى تسهيل تقدم ونمو الورم السرطانى.

٣- **الأشـــــعـــة** **Radiation**

من المعروف أيضاً ان الأشعة تحفز تكوين الورم السرطانى فالأشـــعة فـــوق البنفـــسجية خاصة التى طول موجتها ما بين 280-320nm تحفز تكوين تحور دائم بالــDNA يعـــرف باســـم Thymine dimer والذى هو ارتباط قاعدتين من الثيمين المتجاورتين فى الــDNA ببعضهما ممـــا يؤدى إلى تشويه الحلزون المزدوج للــDNA (شكل ٩٧). واذا لم يحدث اعادة اصلاح لذلك عـــن طريق استئصاله فإنه يسبب احلال لزوج القواعد A-T بدلاً من G-C أو يسبب طفرات تغيير القالب الـــــشفرى.

ونظراً لأن الأشعة فوق البنفسجية لا تنفذ إلى أبعد من الطبقات الأولى مـــن الجلـــد فـــإن الأورام التى تحفز بواسطة الأشعة فوق البنفسجية تكون محدده بسرطانات الجلد ولكـــن مثـــل هـــذه

الأورام تكون حميده ويسهل علاجها. ويوجد طراز آخر من سرطان الجلد يعرف بالميلانوما الخبيثة (Malignant melanoma) يحفز عن طريق الأشعة فوق البنفسجية وهو سرطان قاســى ويــصعب علاجه. كذلك يحتاج هذا الطراز من النمو السرطانى إلى عوامل أخرى منهـا التعـرض الكثيـف للضوء وللشمس القاسيه وربما يرجع ذلك إلى تحرر السيتوكروم من الخلايا المناعية فى الجلد والتى حدث لها تنبيه بواسطة التعرض للشمس القاسية.



شكل(٩٧): تعرض الخلايا للأشعه فوق البنفسجية حيث ينتج عن ذلك تكوين روابط شاذه بين قاعدتين من الثيمين المتجاورتين فى نفس خيط بالــDNA يعرف باسم Thymine dimer مؤدياً إلى انبعاج خيط بالــDNA

والأشعة المتأينة بما فيها أشعة X واشعة جاما تسبب أكسدة النيوكليوتيدات مثل أكسدة الجوانين (8-Hydroxyguanine) واذا لم يحدث لها إعادة اصلاح سوف يحدث ادخال بطريقة الخطأ للثيمين بدلاً من الجوانين فى الــDNA بواسطة إنزيم البلمرة DNA polymerase وبالتالى ينتج عن ذلك احلال قاعدة بيريميدينية محل قاعدة بيورينية.

وتسبب الأشعة المتأينة أيضاً حدوث كسور مفرده فى أحد خيطى الــDNA أو كسور مزدوجة فى كلا خيطى الــDNA . وعلى الرغم من أن هذه الكسور يحدث لها اعادة اصلاح داخل الخلية إلا أن دقة هذا الاصلاح تعتمد على عدد من العوامل منها عدد الكسور فى خيطى الــDNA التى تحدث فى نفس الوقت والمرحلة من دورة الخلية. كذلك ينتج عن الكسور المزدوجة حدوث نقص (Deletion) اثناء الانقسام الخلوى. ومعظم الخلايا التى يحدث لها ضرر شديد فى الــDNA تخضع

للموت الخلوى. والخلايا التى تحتوى على تحورات كبيرة فى الـــDNA غالباً ما تسبب الورم وذلك لتمزيق چينات تنظيم الانقسام الخلوى بصورة معنوية.

٤- الڤيروسات المسرطنة Viral Carcinogens

تسبب العدوى الڤيروسية حوالى ما بين ٥% إلى ١٠% من كل حالات السرطان فى العالم. وفى عديد من الحالات السرطانية فإنه بعد ادماج الچينوم (DNA) الڤيرسى بچينوم (DNA) الخلية العائله يحدث إنتاج للبروتينات الڤيرسية والتى تعارض تنظيم الانقسام الخلوى او التحكم فى دورة الخلية (Cell cycle) فى الخلايا المعدية بالڤيرس حيث يحدث لها نمو عن الخلايا المجاورة مسبباً ذلك الهيبربلزيا وتعزيز انقسام هذه الخلايا. وبعض الڤيروسات مثل ابستين- بار ڤيرس (Epstein-Bar Virus) تكون مرتبطة بحدوث انتقالات للـــDNA ينتج عنها إنتاج كبير من البروتينات التى تنبه دورة الخلية والانقسام الخلوى. وبعض الڤيروسات الأخرى مثل ڤيرس Hepatitis B ينتج عنها التهابات شديدة يترتب عليها تنبيه الانقسام الخلوى بصورة غير ملائمة.

وعلى الرغم من أن بعض طرز الرتروڤيروسات (Retroviruses) التى تسبب السرطان فى الدجاج والفئران كانت فى غاية الأهمية فى اكتشاف الچينات المسرطنة إلى أن عدد قليل من حالات السرطان فى الإنسان ترجع إلى بعض طرز من الرتروڤيروسات. ومن الڤيروسات الأكثر شهرة والتى تصيب الإنسان هو ڤيرس الأيدز (AIDS) Acquired Immuno Deficiency Syndrome الذى يشل النظام المناعى فى الإنسان. وعلى الرغم من أن بعض المرضى بمرض نقص المناعة (الإيدز AIDS) تموت نتيجة للسرطان إلا أن الڤيرس نفسه لا يسبب السرطان بطريقة مباشرة ولكنه يقوم بشل النظام المناعى الذى يهاجم ويقتل الخلايا السرطانية فى المرضى قبل أن تصبح فى مرحلة يصعب التحكم فى السرطان.

وأول حالة حقيقية اكتشفت لبعض طرز الرتروڤيروسات التى تسبب السرطان هى ڤيرس Rous Sarcoma Virus (RSV) حيث انتزع هذا الڤيرس منذ فترة طويلة نسخه من الچين المسرطن من الدجاج (العائل) وهو الچين المسرطن src oncogene . ومن المعروف أن چينوم طرز الرتروڤيروسات هو الـــRNA وليس DNA فعندما يقوم ڤيرس (RSV) بمهاجمة الدجاج يتحول الـــRNA الڤيرس داخل الخلية العائلة إلى الـــDNA عن طريق النسخ العكسى للـــRNA بواسطة

إنزيم Reverse transcriptase ثم يندمج بعد ذلك هذا الـDNA الڤيرسى داخل چينوم (DNA) الخلية العائلة برفقة الچين المسرطن src oncogene الذى يحمله ويسبب التعبير الچينى لهذا الچين المسرطن أورام العضلات المعروفه باسم ساركوما (Sarcomas).

وترجع حوالى ١٥% من حالات السرطان فى الإنسان إلى الڤيروسات التى مادتها الوراثية هى الـDNA مثل ڤيروسات Papilloma وڤيروسات Herpes وهذه الڤيروسات التى تسبب أوراماً سرطانية ترجع إلى أنها تغلق الطريق أمام الچينات الخلوية التى تكبت (Repress) النمو السرطانى وهى الچينات المكبتة (Suppressor genes) وذلك لأن الڤيرس المسبب للسرطان يدمج مادته الوراثية (DNA) فى أحد كروموسومات الخلية العائلة ثم يقوم الڤيرس بتخليق البروتينات الڤيرسية والتى توجد چيناتها فى الـDNA الڤيرسى ثم تقوم هذه البروتينات الڤيرسية بالارتباط بالبروتينات الخلوية التى تثبط الانقسام الخلوى والتى يقوم بإنتاجها الچينين p53, Rb1 ويجعلها غير قادرة على تثبيط الانقسام الخلوى مرة أخرى والذى يؤدى فى النهاية إلى تكوين الورم السرطانى.ومن الڤيروسات المسرطنة مايلى:

١- فيرس البابيلوما فى الإنسان Human Papilloma Virus (HPV)

يوجد أكثر من ١٠٠ سلالة من هذا الڤيرس (HPV) ومعظمها لا تسبب أذى أكثر من تكوين نتوء ورمى صغير. ومع ذلك يوجد سلالتين من هذا الڤيرس هما: HPV-16 و HPV-18 متورطة فى سرطان عنق الرحم (Cervical cancer). وتنتقل هاتين السلالتين عن طريق العلاقة الجنسية حيث يقوم بمهاجمة خلايا عنق الرحم (Cervix). وهذه الطريقة من الانتقال توضح مدى خطورة العلاقة الجنسية مع عديد من الأشخاص كأحد العوامل لحدوث هذا السرطان.

والآليه التى يسبب بها هذين الطرازين من الڤيروسات تحفيز سرطان عنق الرحم تشتمل على بروتينين ڤيرسيين وبروتينين خلويين تنتجهما الخلية العائلة حيث يحمل الچينوم الڤيرس شفرات البروتين E6 والبروتين E7 بينما توجد شفرات البروتين Rb1 (Relimaplasma) والبروتين P53 على چينوم (DNA) الخلية العائلة. وكلاً من البروتين Rb1 والبروتين P53 فى غاية الأهمية لتنظيم الانقسام الخلوى أو تنظيم دورة الخلية. ويرتبط البروتين الڤيرسى E6 بالبروتين P53 ويجعله غير نشط بينما

يرتبط البروتين الڤيرسى E7 بالبروتين Rb1 ويجعله غير نشط أيضاً. وفقد نشاط كلاً البروتينين (P53, Rb1) فى الخلايا المعدية بأى من الڤيرس HPV-16 أو HPV-18 ينتج عنه الورم الاولى (الهيبربلزيا) وفى النهاية تكوين السرطان وذلك لمعارضة البروتينات الڤيرسية تنظيم الانقسام الخلوى للخلية العائلة.

٢- الادينوڤيرس والبليوماڤيرس Adenovirus and Polyomavirus

يوجد عديد من الچينات المسرطنة فى چينوم (DNA) عديد من الادينوڤيروسات والبليوماڤيروسات التى منها ڤيرس السيمين Simian virus (SV40). وتحمل هذه الچينات أيضاً شفرات البروتينات التى تحفز دورة الخلية وتسبب ابتداء تكوين الورم. فالادينوڤيروسات تحمل شفرات نوعين من البروتينات هما E1A و E1B واللذان يرتبطان بالبروتينات الخلوية P53, Rb1 وتجعلهما غير فعالين وظيفياً.

وينتج الڤيرس SV40 بروتين يعرف باسم large T antigen والذى يرتبط بكل من البروتين الخلوى P53, Rb1 ويغلق تأثيرهما فى تنظيم دروة الخلية وينتج عن ذلك تحفيز ابتداء تكوين الهيبربلزيا ولكنه يجعل الخلايا أكثر قابلية لحدوث مزيد من الطفور الوراثى وذلك لان جعل البروتين P53 غير نشط يؤثر أيضاً على عمليات اصلاح الـــDNA.

٣- ايستين- بار ڤيرس Epstein-Bar virus (EBV)

يهاجم هذا الڤيرس بصفة سائدة الخلايا البائية (B cells) الأولية ويحفز تكوين الهيبربلزيا. ومهاجمة الخلايا الطلائية (Epithelical) بالڤيرس EBV يسبب زيادة تعبير عامل نمو الخلايا البائية (B cells) وهو العامل BCRF1 والذى يثبط أيضاً التأثير السام للخلايا التائية (T cells) وينبه عامل النمو BCRF1 الانقسام الخلوى للخلايا البائية كما يحميها من المراقبة المناعية للتأثير السام للخلايا التائية (T cells).

ويحمل الڤيرس EBV شفرات بروتينين هما EBNA-1 و EBNA-2 اللذان تتطلبهما حدوث العدوى وكذلك حيوية الخلايا البائية (B cells) ويتفاعل البروتين EBNA-2 على وجه الخصوص مع

عديد من عوامل النسخ لزيادة تعبير البروتين الخلوى Myc وهو البروتين الذى يتحكم فى التعبير الجينى لعديد من الجينات التى تنتج عديد من البروتينات المنظمة لدورة الخلية.

وفى المناطق من العالم التى تنتشر (Endemic) بها الملاريا يحدث تنبيه لانقسام الخلايا البائية (B cells) فى الأفراد المصابة بطفيل الملاريا وكذلك يخضع هؤلاء الأفراد المصابة بالملاريا لحدوث انتقال كروموسومى متبادل بين الموقع الجينى Myc على الكروموسوم الرابع عشر فى الخلايا البائية (B cells) التى حدث لها بالفعل تنبيه للانقسام الخلوى. ويؤدى هذا الانتقال الكروموسومى إلى وضع الجين Myc تحت تحكم بروموتور قوى وينتج عن ذلك إنتاج مستوى عالى من البروتين c-Myc خلال دورة الخلية. ونظراً لأن هذا البروتين ينظم نسخ جينات السيكلين (Cyclin genes) والتى تتحكم فى مراحل دورة الخلية فإنه يحدث انقسام خلوى للخلايا بسرعة كبيرة منتجاً ورم كبير يعرف باسم Burkitt lymphoma وهو اسم الرجل الذى اكتشف به هذا الورم لأول مره فى شرق آسيا.

٤- فيروسات تليف الكبد B و C Hepatitis B and C Viruses

السرطان الآخر المرتبط بالعدوى الڤيرسية هو سرطان الكبد. فلقد وجدت علاقة تلازمية قوية بين العدوى بكل من ڤيرس تليف الكبد B و C وورم الخلايا الكبدية وبتقدم هذا المرض يحدث تليف للكبد والذى يسببه العدوى الڤيرسية واساءة استخدام الكحول وكذلك الأمراض التى تسبب التهابات حاده بالخلايا الكبدية.

وعندما نتعرض خلايا الكبد الطلائية للسيتوكينين (وهو عامل النمو يفرز بواسطة الخلايا الملتهبة) لفترة طويلة يوجه خلايا الكبد للدخول فى دورة الخلية بصوره أسرع من دورة الخلية الطبيعية. ولقد أوضحت النتائج انه يحدث عدم تنشيط للجين P53 فى المراحل المتأخرة لعديد من حالات أورام الخلايا الكبدية مما يدل على وجود عديد من مراحل تقدم الورم فى الخلايا الكبدية وأن مثل هذه الخلايا يتراكم بها الطفرات بمرور الوقت إذا تعرضت عمليات اصلاح الـــDNA للخطر.

السرطان التلقائى Spontaneous Cancer

يبدأ تكوين الورم السرطانى عن طريق عديد من الطفرات المتنوعة. وكما ذكرنا سابقاً فإن ٩٠% من الأورام السرطانية التى تحدث تكون نتيجة لحدوث الطفرات التلقائية العشوائية وتشترك هذه

الطفرات جميعها فى انها تعرقل تنظيم دورة الخلية او الموت الخلوى والذى يؤدى إلى تكوين الهيبربلزيا.

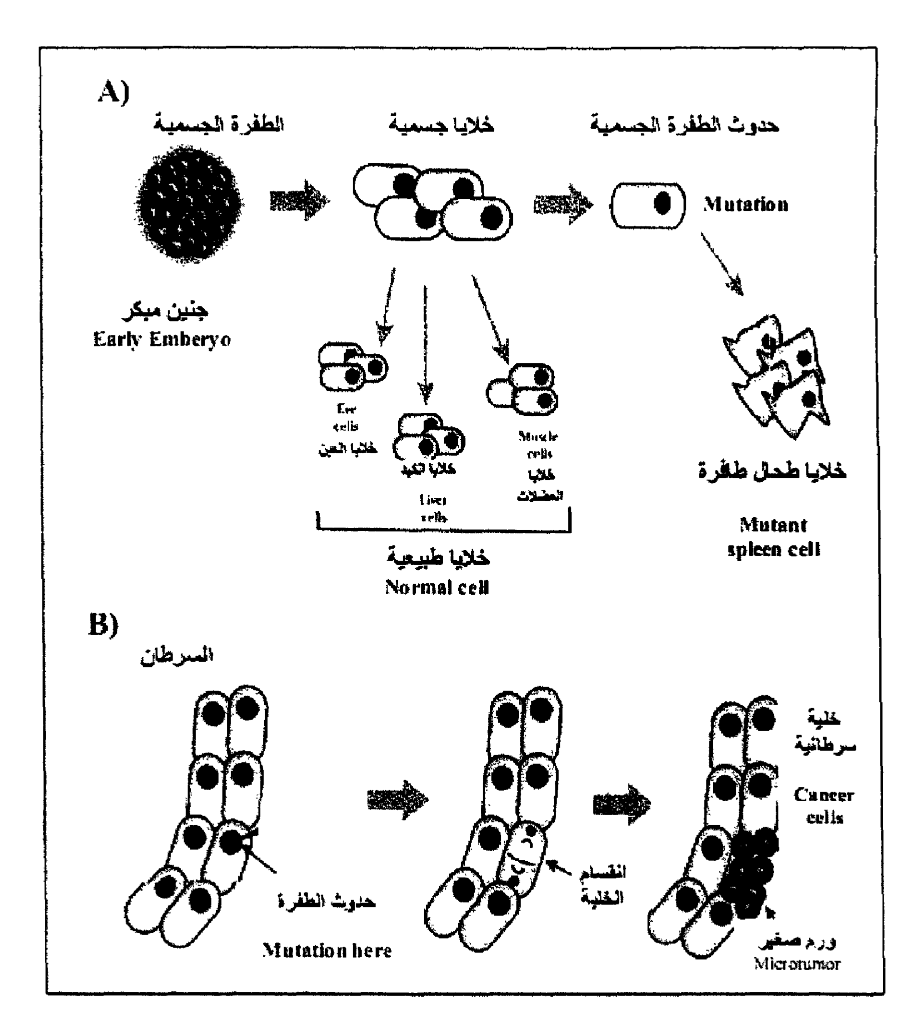
ويوجد قسمين من البروتينات الطافرة التى تسبب الورم السرطانى. فالطفرات التى تحدث فى البروتواونكوچينات ينتج عنها تكوين الچينات المسرطنة (Oncegenes) والذى ينتج البروتين الطافر والذى يحفز تكوين الورم السرطانى. ومن ناحية أخرى فإن الطفرات التى تحدث فى الچينات المكبته للورم (Tumor-suppressor genes) تنتج البروتينات التى تسبب كبت الموت الخلوى (Apoptosis) أو حدوث الانقسام الخلوى بطريقة غير منظمة اثناء الانقسام الخلوى.

المنشأ الوراثى للسرطان Cancer is Genetic Origin

من الواضح أن كلاً من الأمراض الوراثية والسرطان لهما منشأ وراثى. فالأمراض الوراثية هى نتيجة لفشل وراثى يورث إلى النسل عن طريق الخلايا التناسلية (*Germline*) نظراً لحدوث الطفرة التى تسبب المرض الوراثى فى الخلايا التناسلية. وعلى العكس من ذلك يكون

السرطان (Cancer) محدداً بفرد واحد وأنه لا يورث إلى النسل حيث ينشأ السرطان نتيجة لحدوث طفرة فى خلية جسمية (Somatic cell) والتى ينشأ منها باقى أجزاء جسم الكائن وتوجد عديد من الاحتمالات لحدوث الطفرة الجسمية:

١- قد تحدث الطفرة الجسمية فى مرحلة النمو الجنينى المبكرة وبالتالى سوف يكون لها تأثير ضار وربما تأثير مميت عندما تؤدى هذه الطفرة إلى فقد وظيفة أحد أعضاء الجسم الهامة (شكل ٩٨).
٢- قد تحدث الطفرة فى مرحلة النمو الجنينى المتأخرة وينحصر تأثيرها فى خلية واحدة أو عدد قليل من الخلايا وبذلك يصبح تأثيرها أقل معنوية.
٣- قد تحدث الطفرة فى مرحلة نضج الكائن (Adult) ويظل تأثيرها أيضاً خطيراً بالنسبة للكائن. فقد تحدث الطفرة فى خلية جسمية متشكلة ومتوقفة عن الانقسام وتدفعها مرة اخرى للانقسام الخلوى وتكوين الورم الصغير (شكل ٩٨).



شكل (٩٨): الطفرات الجسمية (Somatic mutations)

A. جنين مبكر يحتوى على الخلايا التى سوف تتشكل لتعطى أنسجة الجسم المختلفة وحدوث الطفرة الجسمية فى الخلية التى ستنقسم لتعطى نسيج الطحال مما يترتب عليه تكوين خلايا طحال طافرة.

B. حدوث السرطان نتيجة حدوث طفرة جسمية فى خلية جسمية متشكلة ومتوقفة عن الانقسام تدفعها للانقسام مرة أخرى وتكوين الورم السرطانى الصغير (Microtumor).

وفى الحقيقة ينشأ السرطان نتيجة لحدوث طفرات جسمية تسبب ضرراً فى نظام التحكم فى الانقسام الخلوى للخلايا وغالباً ما يبدأ السرطان بخلية مفردة متشكلة ومتوقفة عن الانقسام الخلوى لفترة طويلة لتبدأ مرة أخرى فى الانقسام الخلوى المتتالى. ويمر السرطان بعديد من المراحل تحتاج إلى عديد من الطفرات الجسمية والتى ينتج عنها ما يلى:

١. فقد الخلية لمقدرتها على التحكم الطبيعى فى الانقسام الخلوى.
٢. تنقسم الخلية الطافرة انقسامات خلوية متتالية مكونة ورم صغير (Microtumor) ومع ذلك يتم تحطيم معظم هذه الأورام الصغيرة بواسطة النظام المناعى بينما يظل البعض الآخر ساكن لعديد من الأشهر أو عديد من السنين حيث يحتوى هذا الورم الاولى (الهيبربلزيا) على ما يقرب من مليون خلية ساكنة لفقدها وسيلة الحصول على غذائها.
٣. إذا حدثت طفرات جسمية أخرى فى خلايا الورم الاولى يبدأ المنال من الأوعية الدموية حيث تصدر الخلايا السرطانية إشارات جزيئية إلى الأنسجة المحيطة بالعملية المعروفة باسم انچيوچنسس (Angiogenesis). وبمجرد أن يحصل الورم الاولى على احتياجاته من الدم يستمر فى النمو ليصل إلى الحجم الكبير ويمكن استئصال الورم فى هذه المرحلة بعملية جراحية إذا كان الورم الكبير محدداً بأحد الأماكن بالجسم ويعرف فى هذه الحالة بالورم الحميد.
٤. إذا حدثت طفرات أخرى فى خلايا الورم الصغير يكتسب بذلك القدرة على مهاجمة أنسجة أخرى وتكوين أورام ثانوية في أماكن متعددة من الجسم ويسمى فى هذه الحالة بالورم الخبيث او ما يعرف بالميتاستاسيس (Metastasis). والسرطان الذى يحدث له انتشار يصعب او يستحيل علاجة.

الانقسام الخلوى الطبيعى (دورة الخلية)

The normal cell division (The cell cycle)

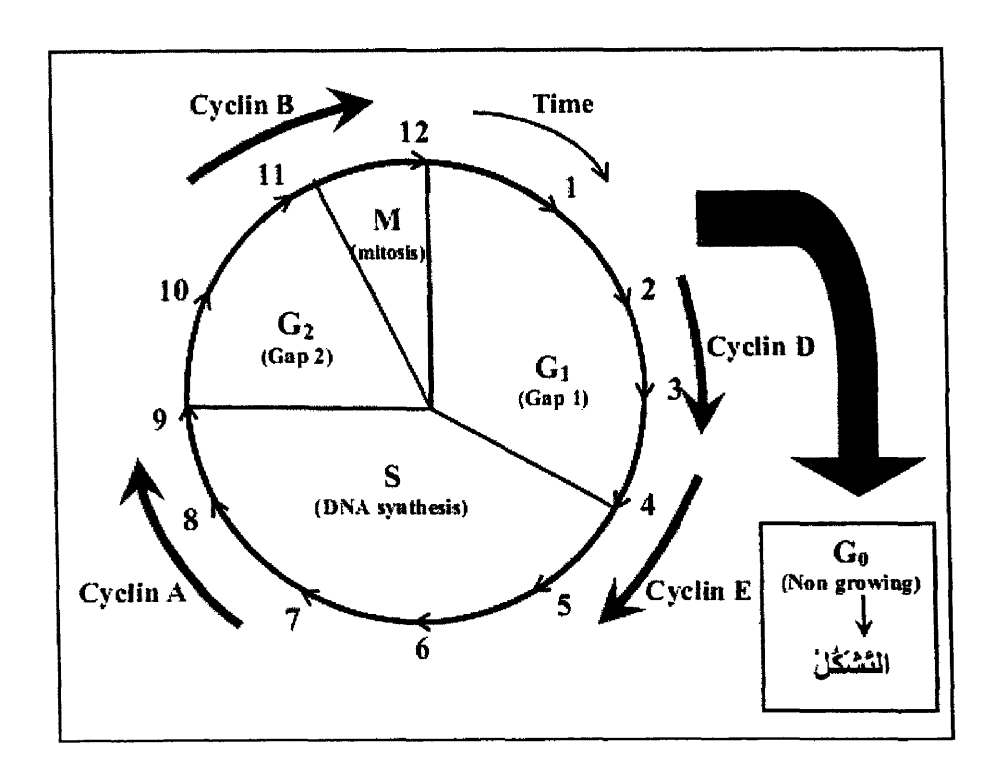
مما لا شك فيه أنه لكى نفهم كيف يحدث السرطان يجب الإلمام بالخطوات التفصيلية للانقسام الخلوى. ففى الكائنات حقيقية النواة تحتوى دورة الخلية على أربعة مراحل هى (شكل ٩٩):

١- مرحلة الـــG_1 phase ويحدث فيها نمو الخلية والأستعداد للانقسام الخلوى.

٢- مرحلة الـــS phase ويحدث فيها تضاعف الـــDNA وبالتالى تضاعف الكروموسومات.

٣- مرحلة الـــG_2 phase يستمر فيها نمو الخلية واستمرار الأستعداد للانقسام الخلوى.

٤- مرحلة الانقسام الميتوزى M (Mitosis) phase وفيها يتم انقسام النواة والخلية وتكوين خليتين جديدتين.



شكل(٩٩): دورة الخلية فى الكائنات حقيقية النواة (Cell Cycle Phases In Eukaryotic Cell) والتى تضم المراحل الأربعة G_1 و S و G_2 و M وبعد إنتهاء دورة الخلية قد تتوقف الخلية عن الانقسام وتدخل مرحلة G_0 لتتشكل (Differentiation) الخلية لتكوين نسيج معين يقوم بوظيفة محددة.

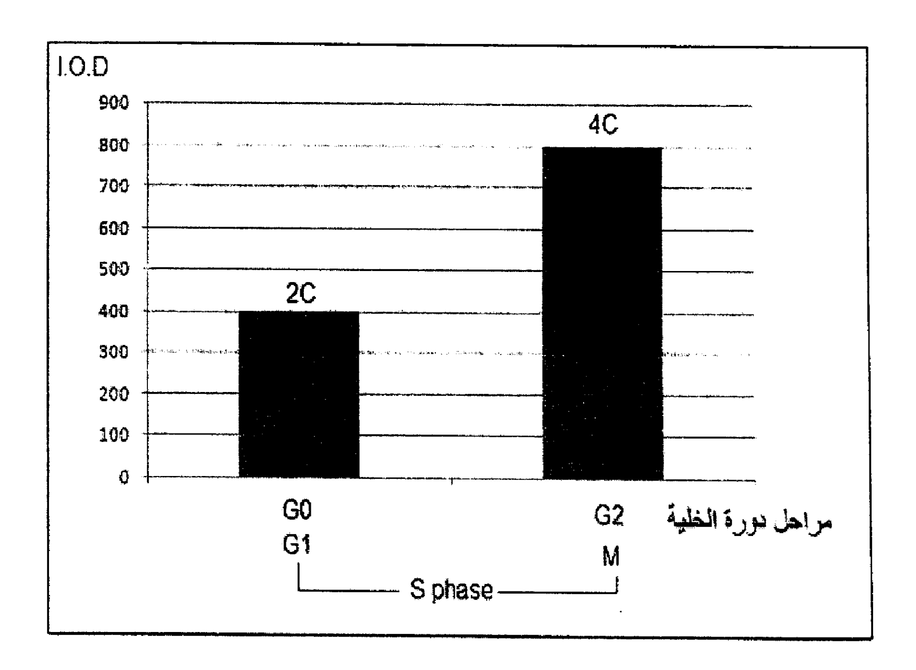
وبعد انتهاء دورة الخلية قد تتوقف الخلية عن الاستمرار فى النمو والانقسام وتدخل فى مرحلة السكون أو مرحلة الــG_0 phase وتكون معظم الخلايا فى هذه المرحلة حيث تتشكل (Differentiated) إلى أنسجة معينة تقوم بوظائف مختلفة ونادراً ما تنقسم هذه الخلايا المتشكلة مرة أُخرى تحت الظروف الطبيعية.

وأثناء دورة الخلية الطبيعية فلكى تنتقل الخلية من مرحلة لأُخرى تحتاج إلى إذن من بروتين السيكلين (Cyclin) والذى يقوم بدوره فى التحقق من استكمال أى مرحلة من مراحل دورة الخلية قبل دخول الخلية المرحلة التالية. ويوجد أربعة طرز من بروتين السيكلين هى سيكلين A و B و D و E ودور كل منهما فى دورة الخلية على النحو التالى:

١. بعد إنتهاء دورة الخلية ولكى تستمر فى النمو والانقسام مرة أخرى فإنها تدخل مرحلة الــG_1 ثم تستقبل إشارة من السيكلين D و E لتدخل الخلية مرحلة الــS phase .
٢. بعد حوالى ٥ ساعات تستقبل الخلية إشارة أخرى من السيكلين A لدفع الخلية للدخول فى مرحلة الــG_2 phase .
٣. بعد أن يصبح السيكلين B نشط يدفع الخلية للدخول فى مرحلة الانقسام الميتوزى (M phase) والانقسام الخلوى.

ويمكن تقدير كمية الــDNA فى المراحل المختلفة من دورة الخلية بطريقة غير مباشرة والمعروفة بالطريقة السيتوفوتومترية (Cytophotometry) وذلك فى عشيرة من الخلايا التى تنقسم ميتوزياً أو النشطة فى الانقسام الخلوى حيث تعتمد هذه الطريقة على تقدير كمية الــDNA مقدرة بوحدات كثافة ضوئية (Integrated Optical Density (I.O.D. فى المراحل المختلفة من دورة الخلية وعمل رسم بيانى لكمية الــDNA فى هذه المراحل المختلفة(شكل ١٠٠). ويلاحظ من هذا الرسم البيانى وجود قمتين لكمية الــDNA أحدهما تمثل كمية الــDNA فى الخلايا التى فى مرحلة الــG_0 ومرحلة الــG_1 بينما تمثل القمة الأخرى كمية الــDNA فى الخلايا التى فى مرحلة الــG_2 ومرحلة الــM وتقع الخلايا التى فى مرحلة الــS phase بينهما.

وتقدر كمية الـــDNA بقيمة تعرف باسم C-value وهى كمية الـــDNA فى الخليـــة الأحاديـــة وعلى ذلك تكون هذه القيمة بمقدار 2C فى الخلايا الثنائية وهذا يفسر وجود قمتين لقيمة الـــDNA فى الرسم البيانى السابق. حيث تمثل القمة الأولى الخلايا التى فى مرحلة الـــG_0 ومرحلة الـــG_1 والتـــى تحتوى على كمية من الـــDNA مقدارها 2C والقمة الثانية تمثل الخلايا التـــى فـــى مرحلـــة الـــــG_2 ومرحلة الـــM حيث تحتوى الخلايا على كمية من الـــDNA تقدر بقيمة 4C وبعـــد إنتهـــاء الانقـــسام الخلوى تتكون خليتين جديدتين كل منهما تحتوى على كمية من الـــDNA مقدارها 2C مرة أُخرى.



شكل(١٠٠): منحنى لكمية الـــDNA مقدرة بوحدات كثافة ضوئية (.Integrated optical density (I.O.D فى المراحل المختلفة من دورة الخلية (Cell cycle phases) فى عشيرة من الخلايا التى تنقسم ميتوزياً mitosis ويلاحظ أن الخلايا التى فى مرحلة الـــG_0 والـــG_1 تحتوى على كمية من الـــDNA مقدارها 2C بينما الخلايا التى فى مرحلة الـــG_2 والـــM تحتوى على كمية مقدارها 4C وأن مرحلة الـــS-phase تقع بينها .

الچينات التى تسبب السرطان Genes that cause cancer

على الرغم من وجود بعض الچينات فى التركيب الچينى (Genotype) تؤثر على القابليه للإصابة بالسرطان والتى تورث إلى النسل مثل أى مرض وراثى آخر إلا أنه يوجد قسمين رئيسين من الچينات التى تؤثر بطريقة مباشرة على حدوث السرطان هما:

١ – البروتواونكوچينات: Proto-oncogenes

اكتشف البروتواونكوچينات لأول مرة فى الڤيروسات التى تسبب السرطان ثم اكتشفت بعد ذلك هذه الچينات فى كل الخلايا الحيوانية وتنظم البروتواونكوچينات عملية الانقسام الخلوى فى الكائنات متعددة الخلايا والذى يحدث تحت نظام من التحكم الدقيق والذى يقوم به البروتواونكوچينات حيث تستمر الخلايا فى النمو والانقسام الخلوى فى الأنسجة المختلفة من الجسم إلى أن يصل النسيج إلى حجمه الطبيعى والصحيح ثم يتوقف بعد ذلك استمرار الانقسام الخلوى.

وإذا حدثت طفرات فى البروتواونكوچينات يترتب عليها حدوث النمو السرطانى وعلى ذلك فإن هذه الچينات ليست مسرطنة بذاتها مالم يحدث بها طفرات وإذا حدثت طفرة فى أحد نسختى البروتواونكوچين (Proto-oncogene) يصبح هذا الچين الطافر مسرطن ويسمى بالاونكوچين (Oncogene) . والطفرات التى تحدث فى البروتواونكوچينات سائدة فى تأثيرها ومن ثم فإن حدوث طفرة فى أحد نسختى البروتواونكوچين تعتبر كافية لحدوث النمو السرطانى وذلك لأن الأليل الطبيعى الآخر لنفس الچين لا يستطيع تعويض هذا الفشل الذى نتج عن حدوث الطفرة. ويصبح هذا الچين الطافر چين مسرطن (Oncogene) يجعل الخلية غير قادرة على التحكم فى الانقسام الخلوى المتتالى مكونة فى النهاية الورم السرطانى Tumor. وتحتوى چينومات (Genomes) الڤيروسات المختلفة على البروتواونكوچينات والتى تطفر إلى الچينات المسرطنة (Oncogenes) بحدوث الطفرات فيها وذلك لأن الڤيروسات حصلت على البروتواونكوچينات أساساً من چينومات الخلايا العائلة التى تهاجمها وتلتقط بعض طرز الڤيروسات أحياناً بعض الـــDNA الخلوى للخلية العائلة وتدمجه فى الچينوم الڤيرسى وقد يحدث أحياناً أن تلتقط هذه الڤيروسات البروتواونكوچينات وتدمجه فى چينومها وبالتالى

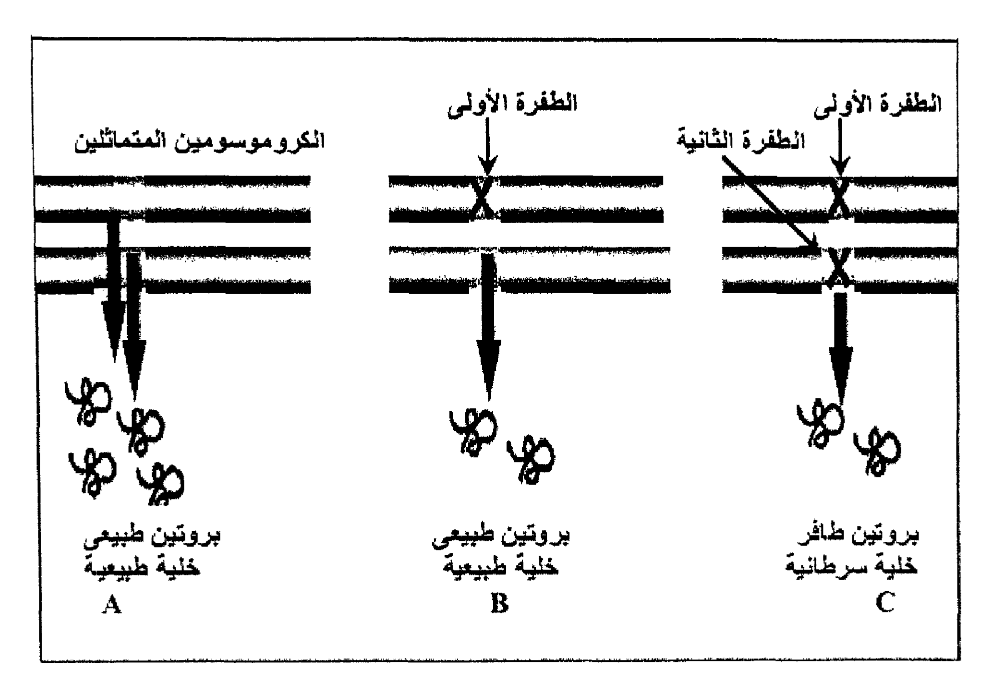
يصبح الڤيرس حاملاً للچينات التى تطفر وتصبح ڤيروسات مسرطنة وعلى الرغم من وجود عدد قليل من الڤيروسات المسببة للسرطان إلا أن معظم حالات السرطان المختلفة التى تحدث فى الإنسان ترجع إلى حدوث الطفرات فى البروتواونكوچينات وتحولها إلى چينات مسرطنة .

٢-الچينات المضادة للسرطان أو الچينات المكبتة للورم

Anti-oncogenes or tumor suppressor genes

الچينات المضادة للسرطان أو الچينات المكبتة للسرطان لها تأثير سالب على الورم السرطانى حيث أنها تكبت (Repress) الاستمرار الخلوى للخلايا السرطانية ولكنها قد تتحول إلى چينات مسرطنة إذا حدثت بها طفرات فى كلا نسختى الچين المضاد للسرطان (Anti-oncogene) حيث أن الطفرة فى نسخه واحده من الچين المضاد للسرطان عديمة التأثير بمعنى أنها طفرات متنحية (Recessive) وإذا حدثت الطفرة فى كلا نسختى الچين المضاد للسرطان تسمى هذه الحالة باسم (Nullizygous) . ومن الچينات المضادة للسرطان الأكثر شيوعاً فى الإنسان الچين (Rb1) والچين p53 حيث أن معظم الأورام السرطانية فى الإنسان يحدث لها كبت باى من الچينين السابقين أو كلاهما . وتوجد طريقتين لكى تصبح كلا نسختى الچين المضاد للسرطان غير فعالة وظيفياً بمعنى أنها تصبح غير قادرة على كبت الورم السرطانى هما:

١- **الطريقة الأولى:** وفى هذه الطريقة يحدث طفرتين جسميتين أثناء الانقسام الخلوى للخلايا التى يتكون منها جسم الكائن حيث تحدث الطفرة الأولى فى أحد نسختى الچين المضاد للسرطان وتحدث الطفرة الثانية فى النسخة الثانية لنفس الچين المضاد للسرطان وبالتالى يصبح ناتج التعبير الچينى لكلا الطفرتين بروتين غير فعال وظيفياً فى كبت (Repression) الورم السرطانى أو عدم تكوين هذا البروتين الكابت للورم السرطانى ومن ثم تتحول هذه الخلية الجسمية إلى خلية سرطانية Cancer cell (شكل ١٠١).



شكل(١٠١) تأثير الطفرات التى تحدث فى الچينات المضادة للسرطان (Anti-oncogenes)

A. كلا نسختى الچين المضاد للسرطان طبيعية ويحدث تعبير چينى لها ويتكون بروتين طبيعى وبذلك تكون الخلية طبيعية.

B. حدوث الطفرة الأولى فى نسخة واحدة من نسختى الچين المضاد للسرطان ونظراً لأن النسخة الأخرى طبيعية فسوف يحدث تعبير چينى لها ويتكون بروتين طبيعى وتكون الخلية طبيعية.

C. حدوث الطفرة الثانية فى النسخة الثانية لنفس الچين المضاد للسرطان وبذلك لا يتكون أى بروتين وتصبح الخلية خلية سرطانية.

٢- **الطريقة الثانية:** وهى الأكثر شيوعاً وأكثرها حدوثاً وتكرار حيث تحدث الطفرة الأولى فى أحد نسختى الچين المضاد للسرطان (Anti-oncogene) فى الخلايا التناسلية وبالتالى تورث هذه الطفرة إلى النسل وبذلك سوف يبدأ الفرد المولود حياته بوجود نسخة طافره من الچين المضاد للسرطان غير فعالة وظيفياً بمعنى فقدها القدرة على إنتاج البروتين الكابت للورم السرطانى أو كبت الانقسام الخلوى

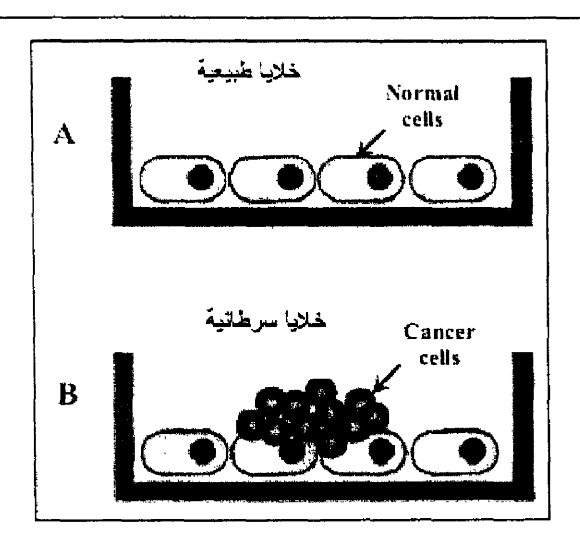
وإذا تصادف وحدثت الطفرة الثانية فى النسخة الثانية لنفس الچين المضاد للسرطان فسوف تصبح كلا نسختى الچين غير فعالة وظيفياً فى كبت الانقسام الخلوى وبالتالى تتحول الخلية من خلية طبيعية إلى خلية سرطانية وتنقسم انقسامات خلوية متتالية بدون تحكم فى الانقسام الخلوى مكونة الورم السرطانى.

اكتشاف الاونكوچينات بواسطة التحول الوراثى

Detection of oncogenes by genetic transformation

إذا أُستخلص الــDNA من الخلايا السرطانية وأُدخل فى خلايا سليمة فسوف يحولها إلى خلايا سرطانية ويعرف هذا بالتحول السرطانى (Cancer transformation). وعلى ذلك إذا وجد اشتباه فى وجود چين مسرطن (Oncogene) فيمكن اختبار ذلك بإضافة عينة من الــDNA المشتبه فيه إلى مزرعة خلوية مناسبة.

فالنمو الطبيعى للخلايا الحيوانية فى مزرعة خلوية لزراعة الخلايا (Cell culture) عادة يحدث بانقسام الخلية الطبيعية بصورة مستمرة مكونة طبقة من الخلايا بسمك خلية واحدة فى جميع الجوانب من طبق الزرع (Culture-dish) ولا يحدث نمو وانقسام لهذه الخلايا لتكون طبقة من الخلايا فوق بعضها حيث أنه بمجرد أن يمتلأ السطح المتاح بالخلايا المتلاصقة من جميع الجوانب يتوقف الانقسام الخلوى وتعرف هذه الظاهرة بالتثبيط بالتلامس (Contact inhibition) كما هو مبين فى (شكل ١٠٢).



شكل(١٠٢): التثبيط بالتلامس (Contact inhibition) والذى يختفى فى الخلايا السرطانية.

A. مزرعة خلوية (Cell culture) لخلايا طبيعية حيث تنقسم وتنمو الخلايا الطبيعية حتى تلامس بعضها من جميع الجوانب مكونة طبقة من الخلايا بسمك خلية واحدة وبمجرد أن يمتلأ السطح المتاح بالخلايا تتوقف الخلايا عن الانقسام والنمو .

B. إذا حدثت الطفرات فى الجينات التى تؤثر على الانقسام الخلوى البروتواونكوچينات فإن الخلايا تستمر فى الانقسام الخلوى مكونة ورم صغير (Microtumor) فى المزرعة الخلوية.

وعلى العكس من ذلك فنمو الخلايا السرطانية يستمر بالانقسام الخلوى المتتالى وتتجمع الخلايا فوق بعضها مكونة كومه (Heap) من الخلايا ولا يحدث تثبيط لانقسامها بتلامسها السطحى ببعضها (شكل ١٠٢) ويمكن مشاهدة هذا النمو السرطانى ورؤيته إذا كان الــDNA المضاف إلى الخلايا الطبيعية يحتوى على چين مسرطن (Oncogene) حيث تظهر كومه الخلايا على صورة ورم صغير (Microtumor) وبأخذ خلايا من هذا الورم السرطانى وحقنها فى حيوانات التجارب مثل الفئران (Mice) فسوف يتكون ورم حقيقى . ومن الخصائص الأخرى المرتبطة بالخلايا السرطانية هى قدرتها على الحركة والإنتقال إلى مناطق أُخرى متشكلة من الجسم وهذا السلوك يكون واضحاً وجلياً فى الأورام السرطانية الخبيثة.

طرز الطفرات التى تولد الاونكوچينات

Types Of Mutation That Generate Oncogenes

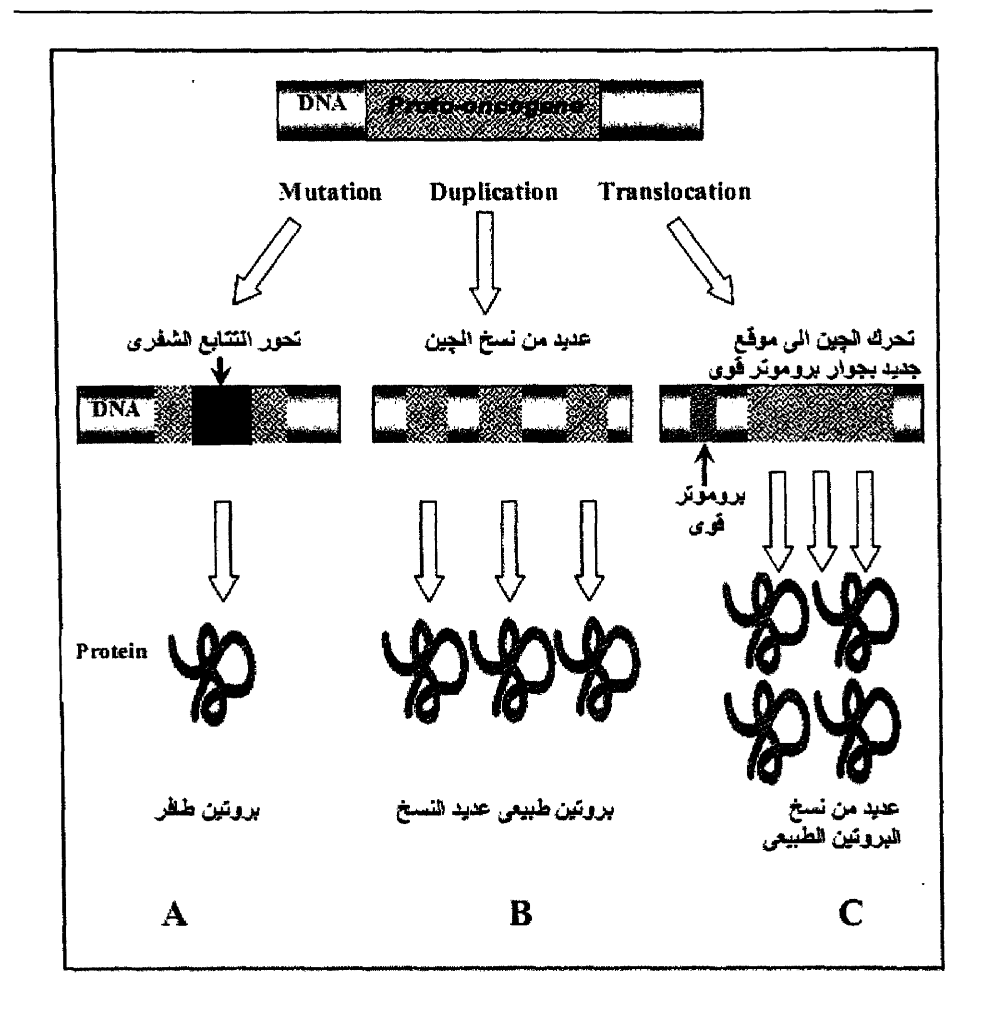
الطفرات التى تحدث فى البروتواونكوچينات (Proto-oncogenes) لتوليد الچينات المسرطنة (Oncogenes) سائده فى تأثيرها ويوجد ثلاثة طرز من الطفرات التى تحدث فى البروتواونكوچينات لتصبح چينات مسرطنة هى (شكل ١٠٣):

١- طفرة تسبب حدوث تغير فى التتابع النيوكليوتيدى فى البروتواونكوچين يترتب عليه تغيير بعض الأحماض الأمينية فى البرروتين الناتج ويصبح بروتين طافر غير قادر على التحكم فى تنظيم الانقسام الخلوى وتتحول الخلية إلى خلية سرطانية.

٢- طفرة ناشئة عن تكرار البروتواونكوچين عديد من النسخ وبالتالى تنتج هذه الطفرة عديد من نسخ البروتين الطبيعى بكمية غير طبيعية.

٣- طفرة ناشئة عن انتقال موقع البروتواونكوچين إلى موقع جديد بجوار بروموتور قوى بسبب زيادة فى التعبير الچينى وبالتالى زيادة مستوى البروتين الناتج.

وتشبه البروتواونكوچينات باقى الچينات الأخرى من حيث احتوائها على المنطقة التى تنظم تعبيرها الچينى بالاضافة إلى المنطقة التى تحمل شفرات البروتين. وبعض الچينات المسرطنة (Oncogenes) ترجع إلى حدوث طفرات فى المنطقة المنظمة والتى تؤدى إلى زيادة التعبير الچينى للبروتواونكوچين ويرجع البعض الآخر من الچينات المسرطنة إلى حدوث الطفرات فى المنطقة التى تحمل شفرات البروتين والتى تؤدى إلى إنتاج بروتين طافر فائق النشاط.



شكل(١٠٣): طرز الطفرات التى تحدث فى البروتواونكوجين (Proto-oncogene):

A. طفرة تحور التتابع الشفرى تؤدى إلى إنتاج بروتين طفرى.

B. الطفرة الناشئة عن تكرار عديد من نسخ البروتواونكوجين تؤدى إلى إنتاج بروتين طبيعى عديد النسخ بمستويات غير طبيعية.

C. الطفرة الناشئة عن انتقال موقع البروتواونكوجين إلى موقع جديد بجوار بروموتور بسبب زيادة فى التعبير الجينى وبالتالى زيادة مستوى البروتين الناتج.

تـقدم التـورم Tumor Progression

معظم البروتواونكوچينات (Proto-oncogenes) والچينات المكبتة للورم (Tumor-suppressor genes) التى تم تحديدها حتى الآن تعمل على تنبيه الانقسام الخلوى حيث ينتج عن الطفرات الأولية انقسام خلوى للخلايا غير متحكم فيه يعرف بالهيبربلزيا (Hyperplasia). وعلى الرغم من أنه مازال هناك مناقشات حول العدد الأدنى من الطفرات التى يحتاجها تقدم الورم الأولى إلا أن التحاليل الاحصائية أوضحت حدوث طفرتين فى البروتواونكوچينات لتكوين الچينات المسرطنة (Oncogenes) أو حدوث طفرتين فى الچينات المكبتة للورم لتجعلها غير فعالة من حيث كبت الورم وهذا هو الحد الأدنى من الطفرات التى يحتاجها تقدم الورم. وبعد أن تنبه الطفرات الأولية تكوين الورم الاولى أو (الهيبربلزيا) فإنه يوجد عديد من الطفرات الإضافية التى تتطلبها عملية تكوين الورم الخبيث.

وفى الحقيقة فإن كل الچينات المسرطنة (Oncogenes) المتولدة نتيجة لحدوث الطفرات الأولية فى البروتواونكوچينات تسرع من دورة الخلية وحدوث طفرات إضافية بعد ذلك يزيد من سرعة دورة الخلية. وعلى ذلك سوف يستمر تراكم الطفرات فى الخلايا التى تؤثر على تنظيم الانقسام الميتوزى وإصلاح الـــDNA وكذلك الموت الخلوى. وحدوث فقد لكلا نسختى الچين المكبت للورم يكون له نفس التأثير.ولقد أوضحت عديد من التحاليل على عديد من حالات السرطانات المتقدمة أنه على الرغم من أن الأورام تكتسب نفس الطفرات إلا أن مكان أو ترتيب هذه الطفرات التى تكتسبها على الـــDNA ليس ثابت

الموت الخلوى Apoptosis

الموت الخلوى هو الممر الخلوى الذى يحتاج إلى تعبير بروتينات خلوية معينة تسبب فى النهاية موت الخلية وينقسم إلى عديد من المراحل هى:

١- مرحلة قبل التكثيف (Pre condensation stage) : وتمثل مرحلة بعد استقبال الخلية اشارة تحفيز موت الخلية وتسبق هذه المرحلة وجود علامات واضحة على الموت الخلوى. وأثناء هذه المرحلة يحدث تنشيط للاشارات الخلوية الداخلية التى تدفع الخلية للموت الخلوى. ويختلف طول هذه المرحلة من خلية لأخرى والذى يعكس عامل النمو البيئى وطبيعة أشارة الموت الخلوى.

٢- مرحلة التكثيف (Condensation stage): وفى هذه المرحلة يحدث تكثيف للسيتوبلازم يشمل فقد الخلية للارتباط والتفاعل بين الخلية التى سوف تموت والخلايا المجاورة وحدوث نقص لحجم السيتوبلازم.

٣- مرحلة التكثيف النووى (Nuclear condensation stage) : وفى هذه المرحلة يحدث تكسير للـــDNA ويعاد توزيعه على حافة المحيط النووى أو على حافة الغشاء النووى للنواة.

٤- مرحلة التجزئه (Fragmentation stage) : وفى هذه المرحلة يتم تجزئة أو تقسيم الخلية التى سوف تموت إلى عديد من الأجسام الميتة.

٥- مرحلة الفاجوسيتيك (Phagocytic stage) : وهى المرحلة النهائية فى الموت الخلوى وفيها يبتلع بقايا الخلية الميتة بواسطة الخلايا المجاورة وينتج عن ذلك موت الخلية بدون مخلفات خلوية والتى تؤثر بصورة سلبية على الخلايا المجاورة.

استحداث الموت الخلوى Induction Of Apoptosis

يبدأ الموت الخلوى بسبب فقد اشارة عامل النمو الخلوى أو بسبب ظهور اشارات الموت الخلوى الداخلية والخارجية. وتأتى عوامل الموت الخلوى الداخلية من داخل الخلية بينما تأتى عوامل الموت الخلوى الخارجية من خارج الخلية ولقد شوهد زيادة عدد الخلايا التى تنمو ببطىء فى عديد من السرطانات مثل سرطان البروستاتا والذى يكون بسبب فشل تنشيط ممر الموت الخلوى الداخلى والذى ينظمه الميتوكوندريا. وتعمل الميتوكوندريا كمؤشر هام بالنسبة للصحة العامة للخلية ويحدث دفع لممر الموت الخلوى الداخلى عن طريق فقد اشارة عامل النمو الخارجى أو بزيادة الاجهاد الخلوى أو حدوث ضرر للـــDNA.

وفى بداية الموت الخلوى يحدث فقد للطاقة الكهربائية الكامنة خلال غلاف الميتوكوندريا. ويحدث دفع الخلية لفقد الطاقة الكهربائية الكامنة عن طريق تكسير البروتين باكس (Bax) إلى البروتين تى باكس (T-Bax) والذى يدخل بدوره فى الغلاف الخارجى للميتوكوندريا مكونا ثقوب تحرر السيتوكروم C (Cytochrome C) من الميتوكوندريا. وفى سيتوبلازم الخلية يرتبط السيتوكروم بالبروتين Procaspase-9 والبروتين Apaf-1 مكوناً ابوبتوسوم (Apoptosome) مؤدياً ذلك إلى تنشيط البروتين Caspase-9 . وهذا التنشيط فى الابوبتوسوم يكسر المركب البادىء Procapase-3 لإنتاج مركب Caspase-3 نشط والذى بدروه ينشط تجزئة الـــDNA إلى قطع.

الباب الثالث عشر

التكاثر الكلونى فى الحيوانات

Clonal Reproduction in Animals

التكاثر الكلونى أو الاستنساخ هو وسيلة من وسائل التكاثر اللاجنسي (Asexual reproduction) فى الحيوانات والذي يجري بواسطة العلماء فى المعامل البحثية ولا يحدث فى الطبيعة.

ويمكن تعريف الكلون (Clone) بأنه مجموعة من الخلايا أو الأفراد المتماثلة والمتطابقة وراثياً والناتجة من خلية واحدة عن طريق الإنقسام الميتوزى المتتالى لتلك الخلية وما يعقبه من تشكل (Differentiation) ونمو إلى أنسجة وأعضاء حتى الوصول إلى الفرد الكامل النمو والتكوين.

ويعتبر التكاثر الكلونى أو الإستتنساخ فى المملكة الحيوانية مخالف لما هو مألوف وطبيعي من حيث حدوث التكاثر الجنسي (Sexual reproduction) عن طريق الإخصاب بين البويضات والحيوانات المنوية ويتطلب التكاثر الكلونى أو الاستنساخ معرفة نوعية وطبيعة الخلايا الحيوانية التى يمكن استخدامها فى التكاثر الكلونى أو الاستنساخ.

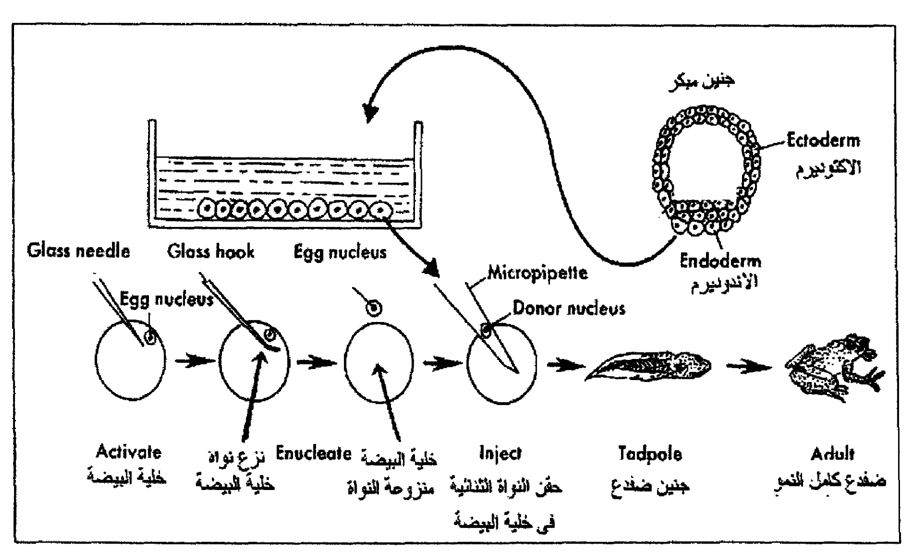
والسؤال الذي يطرح نفسه: هل تصلح جميع الخلايا فى الأعضاء المختلفة لحيوان ما لأستخدامها فى التكاثر الكلونى؟ وللأجابة على ذلك سوف نتناول الأبحاث والتجارب التى أجراها العالمين بريجز Briggs وكنج King عام ١٩٥٢ لدراسة طبيعة ونوعية الخلايا التى يمكن استخدامها فى التكاثر الكلونى حيث قاما بإجراء أبحاثهم على الحيوان البرمائي Rana pipiens (Amphibian) وتتلخص الطريقة التى اتباعاها فى الخطوات التالية (شكل ١٠٤).

وضع جزء من نسيج جنين فى مرحلة البلاستيولا (Plastula) أو فى مرحلة الجاستريولا (Gastrula) أو من برعم الذيل (Tail bud) فى محلول يسبب فصل الخلايا عن بعضها، ونظراً لأن كل خلايا الجنين نشأت من الأنقسام الميتوزي المتتالى لخلية البيضة المخصبة (الجنين) والثنائية (Diploid) فى العدد الكروموسومى (2n) فسوف تكون كل الخلايا الجسمية الموجودة فى تلك القطعة من النسيج المأخوذ متطابقة وراثياً من حيث التركيب الجيني (Genotype).

١. عزل البويضات غير المخصبة (Unfertilized eggs) من الإناث لتصبح خلايا مستقبلة (Recipient cells) وإزالة النوايا الأحادية (Haploid nuclei) من هذه البويضات غير المخصبة وبذلك تصبح خلية البيضة عديمة النواة.

٢. عزل الانوية ثنائية العدد الكروموسومي (2n) من الخلايا الجسمية (Somatic cell) من بعض أنسجة الجنين مع كمية صغيرة من السيتوبلازم وحقنها فى خلية البيضة منزوعة النواة الأحادية وبذلك تصبح خلية البيضة ذات نواة ثنائية (Diploid).

٣. يجري تحفيز هذه الخلايا السابقة على الإنقسام الميتوزى المتتالى مع ملاحظة ومشاهدة تكرار الأجنة التى تنمو بطريقة طبيعية وتلك التى تنمو بطريقة شاذة تؤدى إلى موت الأجنة.



شكل (١٠٤): يوضح مراحل الأستزراع النووى فى الضفدع

Nuclear Transplantation in Rana pipiens

١- أخذ قطعة خلوية من نسيج الأندوديرم وفصل خلاياها عن بعضها.

٢- نزع النواة الأحادية من خلية البيضة لتصبح خلية البيضة عديمة النواة.

٣- حقن النواة الثنائية المأخوذة من خلية الأندودرم الجسمية.

٤- تكوين جنين ضفدع واستمرار نموه لينتج ضفدع كامل النمو والتكوين.

ولقد أوضحت نتائج التجارب التى أجراها العالمين بريجز Briggs وكنج King أنه فى معظم التجارب أو المحاولات التى أجريت وجد أن الأنويه (Nuclei) المأخوذة من خلايا طبقة الأندوديرم (Endoderm) من الأجنة التى فى مرحلة البلاستيولا والتى حقنت فى البويضات المنزوعة النواة أنتجت أجنة طبيعية تماماً مما يدل على أن خلايا طبقة الاندودرم لم تتشكل بالدرجة التى تمنعها من الانقسام الخلوى مرة أُخرى لتكوين أجنة طبيعية بينما الانوية المأخوذة من خلايا طبقة الاندوديرم من الأجنة التى فى مرحلة الجاستريولا (Gastrula) وكذلك المراحل المتأخرة من نمو الجنين عندما حقنت فى خلايا بويضات منزوعة النواة الأحادية كانت نسبة كبيرة من الأجنة تنمو بطريقة شاذة وغير طبيعية وكذلك زيادة فى نسبة موت الأجنة عن تلك الناتجة من الأنوية المأخوذة من خلايا طبقة الأندوديرم من الأجنة التى كانت فى مراحل مبكرة من النمو كما هو مبين فى (جدول ٧). وتوضح هذه النتائج أن الأنوية المأخوذة من طبقة الأندودرم (Endoderm) لأجنة كبيرة العمر أصبحت متشكلة (Differentiated) ولم تعد قادرة على أن تمد الجنين بالمعلومات الوراثية اللازمة لحدوث النمو الطبيعي وتكوين فرد كامل النمو كما تدل هذه النتائج على أن أنوية خلايا طبقة الأندوديرم أصبحت متشكلة وظيفياً لتنتج بروتينات خلايا الأندوديرم ومع ذلك يتضح جلياً أن أنوية االخلايا المتشكلة يمكنها أن تتحول عكسياً للقيام بوظيفة أخري.

جدول (٧): النسبة المئوية للأجنة الشاذة الناتجة من حقن بويضات منزوعة النواة الأحادية بالأنوية الثنائية (Diploid nuclei) مأخوذة من خلايا جسيمة (Somatic cells) من أجنة الحيوان البرمائي Rana pipiens فى مراحل مختلفة من النمو الجنيني

مراحل النمو الجنيني	النسبة المئوية للأجنة الشاذة
١- مرحلة الجاستريولا المبكرة (Early gastrula)	%٢٣
٢- مرحلة الجاستريولا المتأخرة (Late gastrula)	%٨٠
٣- برعم الذيل (Tail bud)	%٩٦

ولقد أجريت تجارب مماثلة بإستخدام الضفدع الأفريقي *Xenopus laevis* ووجد أن الأنوية المأخوذة من خلايا جسمية (Somatic cells) لم يحدث لها تشكل وتخصص وظيفي واضح عند حقنها فى خلايا بويضات منزوعة النواة الأحادية انتجت أجنة طبيعية وكذلك ضفادع كاملة النمو

طبيعية بينما الأنوية المأخوذة من خلايا متشكلة ومتخصصة وظيفياً لم تنجح في تكوين أجنة وتدل هذه النتائج بكل وضوح على أن أنوية الخلايا المتشكلة وظيفياً لا يمكنها العودة مرة أخري لتصبح أنوية قادرة على الأنقسام والنمو والتشكل مرة أخري. كما أوضحت هذه النتائج فى ذلك الوقت الحاجه لمزيد من الأبحاث والدراسات على ظاهرة التشكل النووى(Nuclear differentiation) وخاصة دراسة تلك العوامل التى تؤثر على تحول أنوية الخلايا المتشكلة والمتخصصة وظيفياً إلى أنوية نشطة قادرة على الأنقسام والنمو مرة أخرى وما يعقب ذلك النمو من تشكل وتخصص وظيفي.

وفى الخمسينات من القرن العشرين، كان العالم J.B. Caurdon أول من استخدم التكاثر الكلونى فى إنتاج ضفادع أفريقية للنوع Xenopus laevis وتتلخص الطريقة التى اتبعها فيما يلي:

١– عزل البويضات غير مخصبة(Non-fertilized eggs) من إناث الضفدع الأفريقي *Xenopus laevis*

٢– تحطيم الأنوية هذه البويضات الأحادية (Haploid nuclei) إما بالأشعاع فى بعض التجارب أو إزالة هذه الأنوية الأحادية من البويضات بجراحة دقيقة فى بعض التجارب الأخري وبالتالى تصبح هذه البويضات (Eggs) عديمة الأنوية.

٣– استبدال نواة البيضة الأحادية بنواة ثنائية (Diploid nucleus) مأخوذة من خلايا أمعاء ضفادع صغيرة السن.

٤– تنمية خلايا البويضات المنزوعة الأنوية الأحادية والمستبدلة بأنوية ثنائية والمأخوذة من خلايا أمعاء ضفادع صغيرة السن على بيئة خاصة لزراعة الأنسجة (Tissue culture) وملاحظة ومشاهدة النمو الذي حدث، ووجد ما يلي:

أ– بدأت خلايا البويضات التى تحتوى على الأنوية الثنائية المكتسبة فى الأنقسام الميتوزي المتتالى كما لو كانت هذه البويضات قد أخصبت.

ب– استمرار نمو هذه الخلايا (الجنين) عن طريق الأنقسام الميتوزى المتتالى وما يعقبه من تشكل إلى أنسجة وأعضاء ومروراً بالأطوار الجنينية المختلفة إلى أن وصلت فى بعض الأحيان إلى ضفادع بالغة النمو والتكوين.

ولقد أوضحت نتائج التجارب الأخري التى أجريت على الثكاثر الكلونى (Colonal reproduction) أو الاستنساخ إمكانية استخدام أنوية (Nuclei) خلايا متشكلة (Differentiated) ومتخصصة وظيفياً بالإضافة إلى أنوية خلايا أمعاء الضفادع صغيرة السن فى التكاثر الكلونى حيث تستطيع هذه الخلايا أن توهب (Donor) أنويتها الثنائية (Diploid nuclei) والتى تستخدم فى حقن خلايا البويضات منزوعة النواة لإنتاج توائم من الضفادع المتطابقة وراثياً. وعلى ذلك فإنه ومن المتوقع حدوث التكاثر الكلونى (Colonal reproduction) فى الحيوانات الراقية بما فيها الإنسان، حيث أنه أمكن حل معظم المشاكل الفنية المتعلقة بإستخدام التكاثر الكلونى فى الحيوانات.

ونظراً لأن المملكة النباتية تتميز بخاصية القدرة الكامنة (Totipotency) على التكاثر عن طريق زراعة الخلايا أو زراعة الأنسجة بإستخدام خلايا متشكلة، فإنه يمكن استخدام هذه الطريقة من زراعة الخلايا والأنسجة النباتية لإنتاج نباتات متطابقة وراثياً ليس ذلك فقط بل أنه يمكن إنتاج مئات بل آلافات من النباتات المتطابقة وراثياً بإستخدام قطعة صغيرة من النسيج النباتى ولكن هذه الطريقة ليست تكاثر كلونى والتى تتلخص فى زرع أو حقن أنوية ثنائية (Diploid nuclei) مأخوذة من خلايا جسمية فى خلايا بويضات منزوعة الأنوية.

التكاثر الكلونى فى الثدييات Clonal Reproduction in Mammals

مما لا شك فيه أن التكاثر الكلونى فى الثدييات أكثر تعقيداً منه فى البرمائيات وذلك لأن النمو فى الثدييات يحدث فى داخل رحم أنثي الحيوان بينما يحدث النمو فى البرمئيات فى ماء جاري أو فى طبق معملى. وأيضاً صعوبة الحصول على بويضات الثدييات واستمرارية نموها فى أنبوبة التجارب (in vitro). كذلك تتطلب عملية استخلاص البويضات غير المخصبة واستبدال أنويتها الأحادية بأنوية ثنائية مأخوذة من خلايا جسيمة مهارة كبيرة وأجهزة دقيقة جداً ومع ذلك حدث تقدم ملموس فى التجارب التى أجريت على الثدييات مثل الفئران (Mice) ولقد استمرت الأبحاث والتجارب على التكاثر الكلونى أو الاستنساخ فى الحيوانات الثديية بطريقة مكثفة حتى عام ١٩٩٦ حيث استطاع العالم البريطانى إيان ويلمات Ian Wilmat من النجاح فى استنساخ (Cloning) النعجة دوللى (Dolly).

كلونة (استنساخ) النعجة دوللى Dolly, the cloned sheep

تتميز خلايا الجنين المبكر بالقدرة الكامنة (Totipotent) على الأنقسام الخلوي لتصبح أى طراز من طرز الخلايا مثل الكبد والطحال والمخ وغيرها من الأعضاء الأخري، بينما الجنين الذي فى المراحل المتأخرة من النمو، يفقد هذه القدرة الكامنة لأن خلاياه أصبحت متشكلة ومتخصصة لتصبح أنسجة معينة مثل النسيج العصبي أو النسيج الهضمي وغيرها من الأنسجة الأخري.

ومعظم الخلايا فى الحيوانات البالغة (Adult) إما أنها لا تنقسم مرة أخري أو أنها اصبحت تمثل طرز معينة من الخلايا تقوم بوظائف معينة. ويحدث التعبير الجيني للجينات المختلفة أثناء النمو تبعاً للوظيفة التى تقوم بها الخلايا فى الأنسجة المختلفة حيث يحدث التعبير الجيني لبعض الجينات فى نسيج ما ويكبح أو يكبت (Repress) فى الجينات الأخري فى نفس النسيج ومع ذلك يرتبط التعبير الجيني للجينات بالوظيفة التى تقوم بها فى نسيج ما فضلاً عن أنه لا يحدث التعبير الجيني لكل الجينات فى كل الأنسجة المختلفة من الجسم فى الكائنات الراقية. وعلى الرغم من أن كل الخلايا فى الحيوانات تحتوى على الجينوم (DNA) الكامل، إلا أنه ليس لديها القدرة على إعادة نموها وانقسامها الخلوى مرة أخري لتكوين أفراد جديدة. ولكن استنساخ (Cloning)النعجة دوللى (Dolly) عن طريق التكاثر الكلونى أوضح أن الخلايا المتشكلة لم تصل بعد إلى المرحلة التى يصعب فيها إعادة نموها وانقسامها مرة أخري وأنه يمكن لمثل هذه الخلايا أن تبدأ فى النمو والأنقسام الخلوى مرة أخري. والوسيلة التى استخدمت فى كلونة أو استنساخ النعجة دوللى (Dolly) من الخلايا البالغة (Adult) هى تجويع المزرعة الخلوية المأخوذة من الحيوان الواهب وبالتالى يتوقف تضاعف الــDNA والأنقسام الخلوى وتدخل الخلية مرحلة السكون (G_0 phase) من دورة الخلية وليس معروفاً تماماً ما الذي يحدث للــDNA عند تجويع الخلايا، ومع ذلك فإنه من المحتمل حدوث بعض التغيرات والتحورات للــDNA تشمل إزالة مجاميع الميثايل (Demethylation) من الــDNA وتحوله إلى الصورة الموجود عليها فى الخلية الجينية. فعندما يتم وضع النواة التى فى مرحلة الــG_0 (G_0 nucleus) فى خلية بيضة (Egg cell) منزوعة النواة، فإن هذه الخلية تبدأ فى الأنقسام الخلوى مرة أخري

مكونة جنين والذى ينقل إلى رحم الأنثي الحاضنة، حيث يستمر نمو الجنين بطريقة جيدة ويولد حيوان كامل النمو الجنينى.

وفى عام ١٩٩٦ استطاع العالم البريطانى إيان ويلمات Ian Wilmat من استخدام طريقة التكاثر الكلونى أو الاستنساخ التى استخدمت فى استنساخ الضفادع لأستنتساخ النعجة دوللي Dolly مع بعض التعديلات وتتلخص طريقة استنتساخ النعجة دوللى فى الخطوات التالية (شكل ١٠٥ أ):

١. استخدام نعجة من سلالة اسكتلندية بيضاء الجسم سوداء الوجه لتكون مصدر للبويضات الأحادية (Haploid eggs) التى تم عزلها وإزالة الأنوية الأحادية منها باستعمال أجهزة دقيقة لا تسبب أى ضرر بخلايا البويضات وبذلك تصبح خلايا البويضات عديمة النواة.
٢. استخدام نعجة فنلندية بيضاء الجسم والرأس لتكون مصدر للخلايا الجسيمة ذات الأنوية الثنائية (Diploid nuclei) والمتشكلة والمتخصصة وظيفياً بعزل خلايا ثديية (Mammary cells) من خلايا الضرع والتى تقوم بإفراز اللبن (وهذه النعجة كان عمرها ست سنوات)
٣. وضع الخلايا الثديية المأخوذة من ضرع النعجة الفنلندية على بيئة غذائية مناسبة مع خلايا البويضات منزوعة النواة الأحادية ودفعها للأندماج باستخدام صدمة كهربائية (Electric shock) ومعاملة الخلايا المندمجة بالطريقة التى تجعلها قادرة على النمو الطبيعي مرة أخري من خلال الأنقسام الخلوى المتتالي. وبعد مرور ستة أيام من النمو والأنقسام أعيد زراعة كتلة الخلايا الناتجة فى رحم الأنثي الحاضنة (وهى نعجة اسكتلندية أخري بيضاء الجسم سوداء الوجه) لتقوم كأم حاضنة لحمل الجنين فقط. بعد انقضاء فترة الحمل ومدتها ١٥٠ يوماً وضعت النعجة الأسكتلندية الحاضنة نعجة من نوع النعجة الفنلندية بيضاء الجسم بيضاء الوجه وسميت باسم دوللى (Dolly) والتى كانت نسخة وراثية مطابقة تماماً للنعجة الفنلندية التى أخذ من خلايا ضرعها النواة الثنائية (Diploid nucleus).

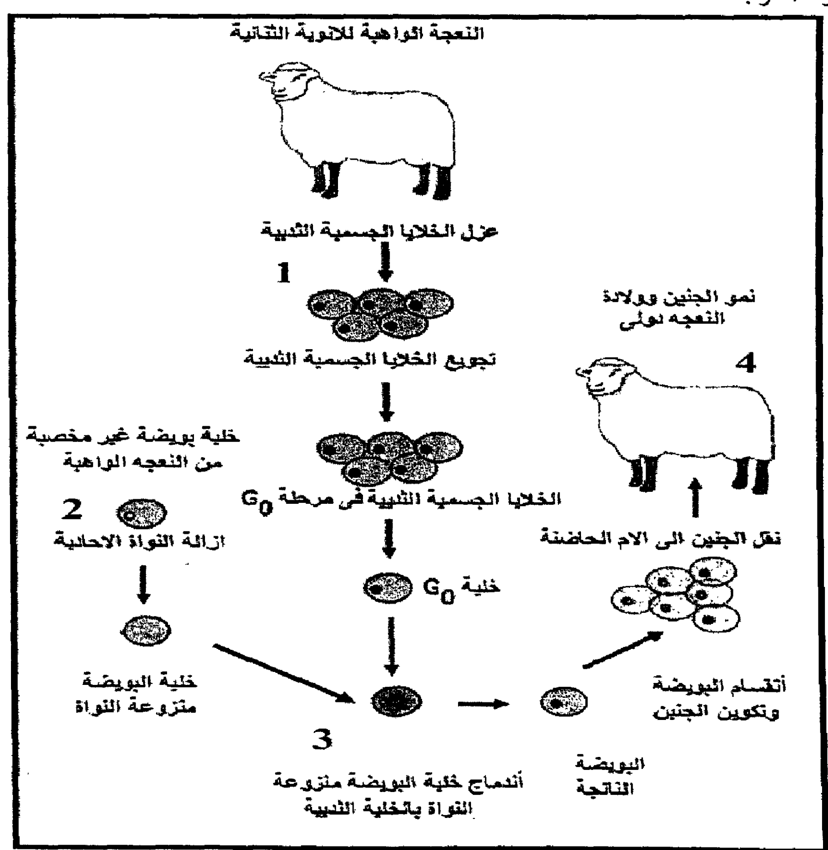
وعلى الرغم من نجاح هذا العالم فى استنساخ النعجة دوللى أو استخدام التكاثر الكلونى فى استنساخ النعجة دوللى، إلا أن فعالية أو كفاءة هذه الطريقة كانت منخفضة جداً حيث قام هذا العالم بإجراء ٢٧٧ تجربة لأدماج الخلايا إلا أن ثلاثة عشر (١٣) حالة فقط هى التى نجحت ونتج عنها حمل وتكوين جنين وأن حالة واحدة فقط من هذه الحالات الثلاثة عشر هى

التى نجحت فى إتمام فترة الحمل بصورة طبيعية وهى التى أنتجت النعجة دوللى (Dolly) ويجب ملاحظة أن استنساخ أو كلونة النعجة دوللى اشترك فى إنتاجها ثلاثة إناث من النعاج هى:

١. الأنثي الواهبة للبويضة أو خلية البيضة (Egg cell) منزوعة النواة الأحادية وهى النعجة الأسكتلندية بيضاء الجسم سوداء الوجه.

٢. الأنثي الواهبة لخلايا الضرع الثنائية وهى النعجة الفنلندية بيضاء الجسم بيضاء الوجه.

٣. الأنثي الحاضنة للجنين والتى قامت بعملية الحمل والولادة وهى نعجة اسكتلندية بيضاء الجسم سوداء الوجه.



شكل (١٠٥): يوضح خطوات كلونة أو استنساخ النعجة دوللى (Cloning Dolly Sheep Steps)

شرح شكل (١٠٥)

١- أخذ خلايا جسمية من الضرع ووضعها فى مزرعة خلوية ثم تجويع هذه الخلايا لتتوقف عن النمو والأنقسام وتصبح فى مرحلة السكون (G_o phase).
٢- عزل خلية بيضة غير مخصبة وإزالة النواة الأحادية منها وبذلك تصبح خلية البيضة عديمة النواة.
٣- حدوث الأندماج للأغشية الخلوية بين خلية البيضة منزوعة النواة وخلية الضرع بواسطة صدمة كهربائية وينتج عن ذلك خلية بيضة تحتوى على نواة ثنائية والتى تنقسم انقسامات خلوية مكونة من مجموعة من الخلايا الجسمية الثنائية والتى يعاد وضعها فى رحم الأم الحاضنة.
٤- ولادة الجنين ونموه بعد ذلك والحصول على النعجة دوللى كاملة التكوين والنمو.

والجدير بالذكر أن النعجة دوللى Dolly المستنسخة قد حملت ثلاث مرات بعد تلقيحها من كبش يدعي ديفيد David وأنجبت من الحمل الأول حمل واحد وفى الحمل الثانى انجبت ثلاثة حملان وفى الحمل الثالث أنجبت حملان ورغم العناية الطبية الفائقة للنعجة دوللى Dolly التى كانت تتمتع بها منذ ولادتها فى تمام الساعة الخامسة مساء ١٩٩٦/٧/٥، إلا أنها توفيت يوم ٢٠٠٣/٢/١٤ عن عمر ستة سنوات وسبعة أشهر وأحدى عشر يوماً وهو عمر صغير بالمقارنة بعمر الأغنام الطبيعي والذي يتراوح ما بين ١٢ إلى ١٦ عاماً.

ويعتبر أستنتساخ أو كلونة النعجة دوللى (Dolly) استنساخ غير كامل أو كلونة غير كاملة وذلك لأنه بالإضافة إلى النواة (Nucleus) الممنوحة والمأخوذة من خلايا الضرع الثنائية والتى تحتوى على كل الچينات، فإن خلية البيضة (Egg cell) الحاضنة منزوعة النواة تحتوى على عدد قليل من الچينات الموجودة فى الميتوكوندريا (Mitochondria) الموجودة بسيتوبلازم خلية البيضة الحاضنة ومن ثم فإستنتساخ النعجة دوللى كان بكلونة (Cloning) الـــDNA فقط المأخوذ من خلية الضرع الثنائية بينما الـــDNA الموجود بالميتوكوندريا كان موجوداً في سيتوبلازم خلية البيضة (Egg cell) الحاضنة منزوعة النواة.

ومنذ مولد النعجة دوللى المستنسخة، أمكن استنساخ أو كلونة عديد من الحيوانات الأخري بما فيها الماشية (Cattle) والخنازير (Pigs) والماعز (Goats) والفئران (Mice) والقطط (Cats) ويوضح (جدول ٨) الحيوانات التى تم استنساخها أو كلونتها وتاريخ استنساخها واسم الحيوان المستنسخ.

وقد نجح العالم الأيطالى Cesare Galli بإستخدام طريقة العالم Ian Wilmat السابقة من استنساخ أو كلونة الحصان وإنتاج أول مهر مكلون أو مستنسخ والذي سمي باسم بروميتيا (Prometea) وقد أوضح هذا العالم أن نجاحه فى استنساخ الحصان سيكون له أثر إيجابي فى مجال التكاثر الكلونى لإكثار جياد السباق الجيدة خاصة التى يتم خصيها على الرغم من صعوبة هذه الطريقة من التكاثر الكلونى، حيث أنه قد أجري ٣٢٨ محاولة من الاستنساخ أو الكلونة ونجح منها محاولة واحدة فقط والتى نتج عنها المهر بروميتيا.

جدول (٨):الحيوانات التى تم كلونتها أو استنسخها وتاريخ الاستنساخ وأسماءها المعروفة بها

Animal	Date	Name
Sheep	1996	Dolly
Mouse	1997	Cumilina
Cattle	1998	
Goat	1999	
Pig	2000	
Gaur	2000	Noah
Mouflon	2001	
Cat	2001	CopyCat
Rabbit	2002	
Banteng	2003	
Rat	2003	
Mule	2003	Idaho Gem
Horse	2003	
Deer	2003	
African Wildcat	2003-4	Ditteaux (male), Madge and Caty (Female)
Dog	2005	Snuppy

فوائد التكاثر الكلونى:

إن قدر الفوائد التى يمكن أن يقدمها التكاثر الكلونى أو الاستنساخ للبشرية يتعدى **كل** التصورات، وفيما يلي بعض الأمثلة للعديد من الفوائد الممكنة للاستنساخ (Cloning) لخدمة الإنسان وهى:

١- يمكن استخدام التكاثر الكلونى أو الاستنساخ لإكثار أنواع من الحيوانات التى تواجه خطر الأنقراض وخاصة تلك التى تتكاثر جنسياً بمعدل منخفض بصورة طبيعية بالمقارنة بالمعدل المرتفع لموتها.
٢- إكثار الأصول الوراثية من الحيوانات الإقتصادية كالأبقار والجاموس والجمال ذات الإنتاج المرتفع من اللحوم والألبان.
٣- إكثار الحيوانات المعدلة جينياً (Transgenic animals) بطريقة سريعة ومنخفضة التكاليف نسبياً لإنتاج قطعان كبيرة من الحيوانات المتطابقة وراثياً.

فلقد أجريت محاولات عديدة نجح بعضها فى إدخال بعض الجينات التى تنتج بعض البروتينات والهرمونات والإنزيمات الهامة فى جينومات (Genomes) بعض الحيوانات وأصبحت هذه الحيوانات المعدلة جينياً تقوم بإنتاج وإفراز هذه المواد الهامة فى ألبانها. ونظراً لأن إنتاج الحيوان المعدل جينياً والذي يحمل الجين المرغوب يكون مكلفاً فقد تصل التكلفة إلى عدة ملايين من الجنيهات وبالتالى يصبح من الضروري الحفاظ على هذا الحيوان المعدل جينياً عن طريق التكاثر الكلونى أو الاستنساخ وذلك لأن تكاثره بالطريقة الطبيعية (التكاثر الجنسي الطبيعي) قد تأخذ أعوام عديدة، بالإضافة إلى ما قد يحدث من إنعزال للجينات أثناء عملية التكاثر الجنسي الطبيعي والذى ربما قد يؤدى إلى فقد الجين المنقول (Transgene) فى النسل الناتج من التكاثر الجنسي الطبيعي.

تحسين الماشية عن طريقة هندسة الممرات الحيوية

Improving livestock by pathway engineering:

يحاول العلماء الأن الجمع بين طريقة التكاثر الكلونى وهندسة الممرات الحيوية لاستنساخ حيوانات محسنة وبالتالى يمكن استخدام الحيوانات المعدلة جينياً، كمصدر لإنتاج البروتينات والهرمونات المفيدة بطريقة اقتصادية، فعلى سبيل المثال، لا توجد الجينات اللازمة لإنتاج الإنزيمات التى لها دور فى الممر التخليقي الحيوي للحامض الأميني السيستين (Cystein) فى الثدييات وبالتالى فإنها لا تستطيع تخليق هذا الحامض الأميني ومن ثم فإنه يجب أن يقدم إلى الحيوانات الثديية فى طعامها أو فى غذائها. ولكن إضافة كميات إضافية من هذا الحامض

الأمينى إلى الغذاء يكون تأثيره ضعيف بسبب تكسيره بواسطة الكائنات الدقيقة الموجودة بأمعاء الحيوانات الثديية.

ويوجد عديد من الأنواع البكتيريه التى تستطيع تخليق الحامض الأميني السيستين (Cystein) فى الممر الحيوي التالى على خطوتين عن طريق إنزيمين هما E1 و E2 :

1 – Acetyl- CoA + Serine $\xrightarrow{\textbf{E1}}$ O- Acetylserine

2- O- Acetylserine $\xrightarrow{\textbf{E2}}$ Cystein

ويحتوى جينوم البكتيريا على الجينين اللذان ينتجان هذين الإنزيمين وهما:

أ- الجينCys K ويقوم هذا الجين بإنتاج إنزيم Serine transacetylase(E1) والذي يحفز الخطوة الأولى من الممر الحيوي.

ب- الجينCys E ويقوم هذا الجين بإنتاج إنزيم Acetylserine sulfhydrylase(E2) الذي يحفز الخطوة الثانية من الممر الحيوي.

ولقد تم كلونة (Cloning) هذين الجينين (CysK, CysE) فى بلازميد بكتيري ووضعا تحت تحكم بروموتور (Promoter) معزول من الفئران (Mouse) والذي ينظم التعبير الچيني لچين الـــMetallothionine فى الفئران وبذلك يصبح البلازميد المعاد توليفه Recombinant Plasmid (R.P.) محتوياً على:

١. الچين CysK والچين CysE
٢. بروموتور چين الميتالوثيونين المعزول من الفئران
٣. العناصر الأخري الضرورية لتضاعف هذا البلازميد المعاد توليفه والسابق ذكرها.

ولقد تم كلونة الفئران بهذا البلازميد المعاد توليفة (R.P.) السابق فى چينوم الفئران (Mouse) وأمكن الحصول على فئران معدلة چينياً Transgenic mouse استطاعت أن تقوم بإنتاج هذين الإنزيمين السابق ذكرهما.

ومما يجدر الإشارة إليه أن بعض الطرق الأخري العديدة التى تجري لتحسين الماشية من خلال إدخال چينات الممرات الحيوية الضرورية لتخليق بعض الأحماض الأمينية الأساسية،

مثل الحامض الأميني الليسين (Lysine) والثريونين (Therionine) مازالت فى المراحل التجريبية الأولى.

مشاكل وأخلاقيات التكاثر الكلونى (الإستزراع النووي)
Problems and Ethics of Clonal Reproduction (Nuclear Transplantation)

الغرض من تكنولوچيا التكاثر الكلونى أو الاستنساخ (Cloning) الحصول على نسخ متطابقة وراثياً تماماً من حيوان ما. ويجب ملاحظة أن الحيوان المستنسخ يبدأ حياته بخلية مفردة والتى تنمو إلى جنين والذي يجب أن يواصل نموه خلال مرحلة الطفولة قبل أن يصل إلى الحيوان البالغ النمو (Adult).

والسؤال الذي يطرح نفسها وخاصة بعد استنساخ النعة دوللي (Dolly) هو: ماذا يحدث لو تم استنساخ الإنسان بطريقة التكاثر الكلونى؟ وفى الحقيقة أجريت مناقشات كثيرة حول استنساخ الإنسان وكان هناك كثير من النقد لاستنساخ الإنسان لأن ذلك يعتبر تهديد لقدسية حياة الإنسان على الرغم من أن استنساخ الإنسان موجود بالفعل فى الطبيعة، المتمثل فى التوأم المتطابقة (Identical twins) والتى هى نسخ متطابقة تماماً ناتجة عن تجزئة نفس البويضة المخصبة إلى جنينين مستقلين متطابقتين وراثياً تماماً. ويعتبر عديد من العلماء القدامى التوأم المتطابقة فى الإنسان هى أفراد خارقة للعادة فى منشأها والبعض الآخر يعتبرهم توائم محظوظة ويعتبرهم بعض العلماء أيضاً أن كلا منهما مؤذي للآخر.وبغض النظر عن الإعتراضات الإخلاقية لإستنتساخ الإنسان بواسطة التكاثر الكلونى، فإنه توجد مشكلتين كبيرتين تواجه استنساخ الإنسان من الناحية العملية هما:

١- أن عدد الأفراد المستنسخة المولودة تمثل نسبة ضئيلة جداً من المحاولات التى تجري من الأستزراع النووي (Nuclear Transplantation)، فالمحاولات التى أجريت على الحيوانات وجد أن عديد من الأجنة النامية تموت فى مرحلة متأخرة من الحمل أو بعد الولادة مباشرة، كما وجد أن بعضها الآخر يحتوى على بعض الشذوذات وبالتالى فإن هذا الاستنساخ محفوف بكثير من المخاطر.

٢-فرصة نجاح الحمل فى الأم الحاضنة فى الإنسان يكون قليلاً جدا من فرصة نجاحه فى حالة الأغنام وبالتالى فإن التكلفة المالية والمجهود المبذول لإنتاج نسخ من إنسان ما

تكون أكبر بكثير جداً من استنساخ الحيوانات، مثل الأغنام. وبغض النظر عن سيناريو الخيال العلمى، فإن سبب رغبة الإنسان فى استنساخ نفسه غير واضح. ونظراً لأن الوقت الذي يحتاجه نمو الإنسان طويل فإن ذلك يعنى أن استنساخ الإنسان لن يكون متاحاً لعديد من السنين المقبلة.

مشاكل النمو في الحيوانات المكلونة أو المستنسخة

Development Problems in Cloned Animals

مازالت معظم محاولات استنساخ الحيوانات تواجه فشلاً كبيراً رغم معرفة المشاكل التكنولوجية التى تواجه هذا الاستنساخ أو الكلونة عن طريق الأستزراع النووى (Nuclear Transplantation) والذي يتضمن إعادة برمجة النواة (Nucleus) المأخوذة من الخلية المتشكلة والمتخصصة وظيفياً وهى عملية معقدة جداً ويحتمل أن المعدل المنخفض من النجاح فى استنساخ الحيوانات يرجع إلى الفشل فى إعادة برمجة النواة المستخدمة فى الأستزراع النووى كما ينبغى. ولقد أوضحت الأبحاث الحديثة أن عملية إضافة مجاميع الميثايل للـــDNA هى العامل الرئيسي فى إعادة برمجة النواة المستخدمة فى الأستزراع النووى، حيث وجد أن هذه العملية (DNA methylation) فى الأجنة المستنسخة ليست مطابقة لمثيلاتها فى الأجنة الطبيعة وكذلك بالنسبة الحيوانات البالغة المستنسخة ومثيلاتها الطبيعية، ومع ذلك فإن النعجة دوللى (Dolly) المستنسخة وكذلك للحيوانات المستنسخة الأخري انتجت نسلاً طبيعياً من الناحية الوراثية وبالتالى فإن الاستنساخ لم يسبب حدوث تحورات وراثية فى النسيج التناسلي للحيوان المستنسخ.

وعادة ما يسبب إضافة مجاميع الميثايل للـــDNA غلق أو قفل التعبير الچيني لچينات الكائنات حقيقية النواة التى لاتكون هناك حاجة لتعبيرها الچيني فى أنسجة معينة أو فى مراحل معينة من النمو. وغالباً ما تنتج الحيوانات المستنسخة عدد كبير من النسل يحمل اعراضاً مظهرية معينة، حيث تكون أطرافها وأعضائها الداخلية من الجسم أكبر بصورة غير طبيعية وبالتالى فإن هذه الحيوانات أو هذا النسل الناتج من الحيوانات المستنسخة يكون ضعيف صحياً وهذه الأعراض ترتبط بالتعبير الخاطئ للچين (EGF2R)، حيث وجد أن هذا الچين حدث له تحور بإضافة مجاميع الميثايل وذلك فى الأجنة التى تحمل أعراضاً غير طبيعية.

الرئيسيات المعدلة چينياً Transgenic Primates

حتى الآن لم تنجح محاولات استنساخ الرئيسيات (Primates) والتي منها القرود والإنسان، ومع ذلك أمكن الحصول على قرد من فصيلة الريسيس (Rhesus) والمعدل چينياً (Transgenic Rhesus Monkey). فأول محاولة ناجحة لإنتاج رئيسيات معدلة چينياً كانت بمولد القرد أندى (Andi) وهو قرد من فصيلة الريسيس (Rhesus) يحمل الچين GFP وذلك فى نهاية عام ٢٠٠٠ ميلادية على النحو التالى:

١- استخدام الرتروفيرس (Retrovirus) كحامل (Vector) للچين GFP ونقله إلى الخلية العائلة.

٢- عزل بويضات غير مخصبة من القرد ريسيس (Rhesus).

٣- معاملة هذه البويضات غير المخصبة بالرتروفيرس الحامل للچين GFP فى أنبوبة الأختبارثم إخصاب هذه البويضات بعد ذلك فى أنبوبة الأختبار أيضاً.

٤-أجريت ٢٢٤ محاولة من استخدام ٢٢٤ خلية بويضة (Egg cells) غير مخصبة ومعاملتها بالرتروفيرس الحامل للچين وأمكن الحصول على ٢٠ جنين فقط والتى تم نقلها إلى الأمهات الحاضنات. ونجح ٥ حالات حمل من بين الحالات التى أجريت للأمهات الحاضنات نتج عنها ثلاثة ذكور حية من القرد الريسيس (Rhesus) كان واحداً منهما فقط معدلاً چينياً (Transgenic rhesus) يحتوى على الچين (GFP) على الرغم من أن التعبير الچيني له كان بصورة منخفضة فى القرد الناتج والمعدل چينيا . ومما يجدر الإشارة إليه أن استنساخ القرود من فصيلة الريسيس (Rhesus) كان عن طريق تجزئة الجنين المكون من ثمانية خلايا إلى أربعة أجنه متطابقة وراثياً كل جنين كان يتكون من خليتين من الخلايا الثمانية والتى استخدمت فى استنساخ القرد الريسيس (Rhesus)، وعلى ذلك فإن هذه القرود المستنسخة هى توائم صناعية وليست ناتجة عن طريق الأستزراع النووي (Nuclear Transplantation) الحقيقي كما فى حالة استنساخ النعجة دوللى (Dolly) ولكن من الواضح أن القرود من فصيلة الريسيس (Rhesus) تم استنساخها بالطريقة السابقة.

ويبدو واضحاً أنه لا يوجد سبب من الناحية العلمية يمنع استنساخ القرود والإنسان عن طريق الأستزراع النووى ولكن من أهم الأهداف الممكنة الأستخدام الاستنساخ فى الإنسان هو

استنساخ الأنسجة (Tissue Transplantation) للحصول على أنسجة سليمة والتى تستخدم فى الأغراض الطبية العلاجية بدلاً من توليد أفراد من بنى الإنسان جديدة، فإعادة برمجة خلايا الإنسان وتنميتها فى مزارع الأنسجة للحصول على الأنسجة المرغوبة مثل نسيج كبد أو كلى أو غيرها يمكنه أن يقدم خدمة كبيرة للمرضي من بنى الإنسان بتليف الكبد أو الفشل الكلوى وهذا ما يعرف بالاستنساخ العلاجى (Therapeutic Cloning) والذي بدأ بالفعل يخطو بخطى سريعة.

References المراجــع

1- Coldberg ,Ann E.Reynolds,Lee M.Silver and Ruth C.veres (2004). Genetics: From genes to genomes . Mc Graw-Hill Companies.Inc.

2- David P.Clark and Nanette J.Pazdernik (2004) . Biotechnology : Applying the genetic revolution . Elsevier . Inc.

3- Eldon John Garder , Michael J.Simmons and Peter D.Snustud (1991). Principles of Genetics . John Willey and Sons , Inc .

4- George W.Burns and Paul J.Bottino (1989). The Science of Genetics . Macmillan Publishing Company , a division of Macmillan , Inc .

5- Gupta P.K. (2004).Biotechnology and Gemonics . Rakeoh Kumar Rastogi For Rastogi Publications . INDIA .

6- Leon Snyder , David Freifelder and Daniel Harlel (1985) .General Genetics Jones and Bartlett Publishers . Inc., 30 Granda Court , Portola Valley , CA94025.

7- Peter D.Snustad and Michael J.Simmons (2006). Principles of Genetics. John Willey and Sons , Inc .

8- Robert J.Brooker (2005).Genetics: analysis and principles . Mc Graw-Hill Companies.Inc.

9- Swamy P.M. (2009).Laboratory manual on biotechnology. Rakeoh Kumar Rastogi For Rastogi Publications . INDIA .

10- William S.Klug , Michael R.Cummings and Charlotte A.Spencer (1983). Concepts of Genetics.C.E.Merrill Publishing Company.

المراجــع العربيــة

منيــر السعيد محمد موســى ومحمد محمد عبد الفتاح ياقوت . ٢٠٠٤ . أساسيات علم الوراثة . الشنهابى – الاسكندرية . مصــر.

Glossary
مُسرد وشرح المصطلحات

A

Activate protein **البروتين المنشط**

هو البروتين الذى ينشط عمل الچين.

Ada gene **الچين أدا**

هو الچين الذى يحمل شفرات إنزيم أدينوزين دى أمينيز.

Adaptation **التأقلم**

أى خاصية أو صفة فى كائن ما تحسن فرصته فى الحياة والتكاثر فى بيئته.

Adenoviruses **الأدينوڤيروسات**

عائلة صغيرة من الڤيروسات التى مادتها الوراثية خيط مزدوج من الـــDNA والتى تهاجم الحيوانات.

Aggressive gene therapy
العلاج الچينى العدوانى

علاج السرطان بادخال الچينات أو ناتج الچين والذى يعمل على قتل الخلايا السرطانية.

AIDS (Acquired immunodeficiency syndrome) **نقص المناعة المكتسبة**

هو المرض الذى يسببه الرتروڤيرس HIV والذى يصيب النظام المناعى عن طريق تكسير الخلايا المناعية التائيه (T cells).

Allele **الأليل**

هو واحد من بين الاشكال المختلفة لچين ما.

Amino acid **الحامض الأمينى**

هو أى واحد من قسم الجزيئات العضوية التى تحتوى على مجموعة أمينو ومجموعة كربوكسيل. ويوجد ٢٠ حامض أمينى مختلفة والتى يتركب منها البروتينات المختلفة.

Amino acid attachment site
موقع ارتباط الحامض الأمينى

هو الطرف $3'$ من جزىء الـــtRNA والذى يرتبط به الحامض الأمينى.

Aminoacyl site (A site)
موقع دخول الحامض الأمينى

هو أحد مكونات الريبوسوم التى يرتبط بها الـــtRNA ويعرف بالموقع A (A sit).

Aminoacyl tRNA synthetase
إنزيم ربط الحامض الأمينى بالـــtRNA

هو الذى يربط الحامض الأمينى الصحيح بالحامض النووى الناقل tRNA الخاص بنقل هذا الحامض الأمينى.

Amino terminous **مجموعة الأمينو الطرفية**

هو طرف السلسلة عديدة الببتيد والتى تنتهى بحامض أمينى يحمل مجموعة أمينو حره.

Antibody **الجسم المضاد**

هو بـــروتين ما يوجد فى سيرم الدم وينتج فـــى الحـــيوانات استجابة لأنتيچين خاص والقادر على الارتباط بالأنتيچين.

Anticodon **الشفرة المضادة**

هى القواعد الثلاثة فى جزىء الـــtRNA والمكملة لثلاثة قواعد لشفرة خاصة فى الـــmRNA

Antigen **أنتيچين**

أى مادة قادرة على تنبيه إنتاج أجسام مضادة خاصة

Anti-oncogene **الچين المسرطن المضاد**

هو الچين الذى يعمل لمنع الانقسام الخلوى غير المرغوب مثل الچين المكبت للورم.

Antiparallel **الإتجاه المعاكس**

هو مصطلح يستخدم لوصف الإتجاه الكيميائى

Backcross **التلقيح العكسى**

هو تلقيح الجيل الأول F_1 الخليط مع أى فرد يحتوى على نفس التركيب الچينى لأحد الأبوين.

Bacteriophage **بكتيريوفاج**

هو ڤيرس عائله الخلية البكتيرية ويسمى بالفاج بصفة عامة.

Base pair **زوج القواعد**

زوج من القواعد النيتروچينية وغالباً ما تكون إحداهما قاعدة بيورينية والأخرى بيريميدية واللذان يرتبطان بعضهما بروابط هيدروچينية فى خيطى الـــDNA مزدوج الخيط.

β -Galactosidase **إنزيم بيتاجالكتوسيديز**

هو الإنزيم الذى ينتجه چين ما فى اوبرون اللاكتوز والمسئول عن تكسير سكر اللاكتوز.

Bioremediation **البيوريميديشن**

استخدام كائنات دقيقة مثل الفطر أو النبات أوالإنزيم لتنظيف البيئة او إعادة البيئة لحالتها الطبيعية.

Blunt ends **الأطراف العمياء**

هو نهاية جزىء الـــDNA والذى يكون فيه كل أزواج القواعد الطرفية مرتبطة ببعضها بروابط هيدروچينية ويستخدم هذا الإصطلاح عادة ليشير إلى الأطراف الناتجة التى يحدثها بعض إنزيمات القطع المحدد.

Bt toxin **المركب السام Bt**

هو المركب السام الذى يوجد فى بكتيريا التربة والذى يقتل بعض أنواع يرقات الحشرات التى تحطم المحاصيل.

C

Callus **الكالس**

مجموعة أو كتلة من الخلايا غير المتشكلة من الخلايا النباتية.

لخيطى الـــDNA فى الحلزون المزدوج للـــDNA حيث يكون الإتجاه 3/ ⟵ 5/ فى إتجاه معاكس للآخر.

Antisense (Noncodling)

خيط الـــDNA غير الشفرى

خيط الـــDNA الذى يحمل التتابع النيوكليوتيدى غير المكمل لذلك التتابع النيوكليوتيدى الموجودبالـــmRNA.

Antisense RNA

خيط الـــRNA المكمل لخيط الـــmRNA

هو خيط الـــRNA الذى يحمل التتابع النيوكليوتيدى المكمل لخيط الـــmRNA والذى يحدث بينهما الاقتران بين أزواج القواعد.

Apoptosis (Programmed cell death)

الموت الخلوى

هو البرنامج الوراثى الذى يقوم بإزالة الخلايا التى أصابها الضرر أو لخلايا التى ليس هناك حاجة اليها بدون تنشيط النظام المناعى.

Apoptosome **ابوبتوسوم**

هو مجموعة من الاشارات البروتينية المركبة والتى تنشط المركب Caspase-3 فى الثدييات أثناء الموت الخلوى.

Aporepressor **آبوريبريسور**

هو البروتين الذى يتحول إلى كابت عندما يرتبط به جزىء خاص آخر.

ATP (Adenosine triphosphate)

الأدينوزين ثلاثى الفوسفات

الأدينوزين ثلاثى الفوسفات وهو الجزىء الأولي لتخزين الطاقة فى الخلية الحية.

B

B cells **الخلايا البائية**

خلايا الدم البيضاء والمشتقة من النخاع والتى تمتلك القدرة على إنتاج الاجسام المضادة.

Chromatin **الكروماتين**

هو ارتباط الـــDNA ببروتينات الهستون ليُكوّنْ كروموسومات الكائنات حقيقية النواة.

Chromosome **كروموسوم**

فى الكائنات حيقية النواة هو عبارة عن جزىء الـــDNA الذى يحمل الجينات فى ترتيب طولى حيث يرتبط به عديد من البروتينات ويحتوى الكروموسوم إلى تلومير فى كلا طرفيه وسنترومير. وفى الكائنات غير حقيقية النواة يرتبط بالـــDNA قليل من البروتينات وينقصه التلومير والسنترومير وغالباً ما يكون دائرى. وفى الفيروسات قد يكون الكروموسوم عبارة عن الـــDNA أو الـــRNA مفرد الخيط أو مزدوج الخيط فى صورة خطية أو دائرية وغالباً ما يكون خالياً من البروتينات.

Cis position **الوضع التجاذبى**

هو ترتيب الجينات المرتبطة فى فرد ما خليط فى طفرتين حيث حصل على الموقعين الطفرين من أحد الأبوين بينما حصل على الموقعين البريين من الأب الآخر مثل $a^1a^2/++$.

Cistron **سسترون**

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى من الـــDNA الخاص بوظيفة مفردة كما تم تعريفه بواسطة اختبار التكامل. وهو التتابع النيوكليوتيدى الذى يحمل شفرات نوع واحد من البروتينات يعرف بالجين.

Clone **الكلون**

مجموعة من الكائنات المشتقة من أب مفرد والمتطابقة وراثياً مع هذا الأب وأيضاً فى الهندسة الوراثية يشير هذا الاصطلاح إلى ربط جين ما أو قطعة من الـــDNA إلى جزىء من الـــDNA قادر على التضاعف مثل البلازميد أو الفاج.

Callus culture **زراعة الكالس**

إعادة تشكيل كتلة من النسيج النباتى فى أنبوبة الاختبار ثم بعد ذلك تنمية النسيج غير المتشكل فى طبق بترى.

Cancer **السرطان**

هو نسيج أو مجموعة من الخلايا المتجمعة والناتج عن نمو الخلية وانقسامها بطريقة غير متحكم فيها وان هذا الانقسام الخلوى يرجع إلى حدوث طفرات جسميه تؤثر على الانقسام الخلوى.

Carboxyl terminous
مجموعة الكربوكسيل الطرفية

هو طرف السلسلة عديدة الببتيد التى تنتهى بحامض أمينى يحمل مجموعة كربوكسيل حرة.

Carcinogen **المسرطن**

هو مركب طبيعى أو كيميائى يسبب السرطان.

c-DNA strand **خيط الـــ c-DNA**

هو خيط مكمل لأحد خيطى الـــDNA.

Cell cycle **دورة الخلية**

هى دورة النمو للخلية المفردة فى الكائنات حقيقية النواة والتى تنقسم إلى المراحل M, G_2, S, G_1.

Charged tRNA **الـــ tRNA المحمل**

هو اى حامض نووى ناقل (tRNA) محمل بحامض أمينى مرتبط به.

Chimeric animal **الحيوان الكيميرى**

هو الحيوان الذى تختلف خلاياها المختلفة فى التركيب الوراثى.

Chloroplast transit peptide
ببتيد البلاستيدات الخضراء الموقت

سلسلة عديدة الببتيد صغيرة تضاف إلى الطرف الذى يحتوى على مجموعة الأمينو إلى بروتين ما يوجه دخول البروتين من الريبوسوم إلـــى البلاســتيدات الخضراء.

يقعان فى وحدتين وظيفيتين مختلفتين وبالتالى تكون غير أليلية.

Conserved sequence

التتابع النيوكليوتيدى المحفوظ

هو ذلك التتابع من القواعد بالـــDNA والذى نادراً ما يحدث له تغيير طفيف جداً بعد ملايين من السنين

Core enzyme **الإنزيم المركزى**

هو جزىء إنزيم البلمرة RNA polymerase الذى ينقصه الوحدة البروتينية التى تتعرف على البروموتور.

D

Deletion **النقص**

فقد قطعة من المادة الوراثية لكروموسوم ما.

Deoxyribonuclease

إنزيم الديزوكسى ريبونيوكلييز

هو إنزيم ما يكسر الرابطة الفوسفودايستر فى الـــDNA مكوناً قطع من الـــDNA أو نيوكليوتيدات.

Deoxyribose **الديزوكسى ريبوز**

سكر خماسى يوجد فى الـــDNA.

Diploid **الحالة الثنائية من الكروموسومات**

هو الخلية أو الكائن الذى يحتوى على مجموعتين كاملتين من الكروموسومات المتماثلة.

Direct repeat **التكرار المباشر**

نسختين من الـــDNA أو الـــRNA والتى تحتوى على نفس التتابع فى نفس الإتجاه من النيوكليوتيدات.

DNA (Deoxyribonucleic acid)

حامض الديزوكسى ريبونيوكليك

هو جزىء كبير يتركب عادة من سلسلتين عديدة النيوكليوتيدات فى صورة حلزون مزدوج الخيط

Cloned animals **الحيوانات المكلونه**

حيوانات متطابقة وراثياً اشتقت من نفس الخلية الأصلية.

Cloning vectors **حوامل الكلونه**

هو أى جزىء من الـــDNA قادر على التضاعف الذاتى داخل خلية ما ويستخدم فى حمل الچينات المكلونه أو قطع من الـــDNA وغالباً ما يكون بلازميدات أو ڤيروسات محوره .

Cloning vehicle **حامل الكلونه**

هو جزىء من الـــDNA قادر على التضاعف والذى حدث به إدخال لچين ما أو قطعة من الـــDNA عن طريق تكنيكات إعادة توليف الـــDNA وأيضاً يسمى بالحامل vector.

Coding strand

الخيط الشفرى أو الخيط القالب

فى چين ما هو ذلك الخيط من الـــDNA الذى يحدث له نسخ.

Codon **الشفرة**

هو ذلك التتابع من ثلاثة نيوكليوتيدات فى جزىء الـــmRNA الخاص بالتعبير عن حامض أمينى أو كإشارة توقف لاستمرار تخليق البروتين.

Cohesive ends **الأطراف المُلحمه**

خيوط الـــDNA المفرده المكمله عند أطراف الـــDNA مزدوج الخيط.

Complementary DNA

خيط الـــDNA المكمل

هو جزىء الـــDNA الناتج من نسخ خيط الـــRNA بواسطة إنزيم النسخ العكسى ويشار إليه عادة بالـــc-DNA.

Complementation test **اختبار التكامل**

هو اختبار وراثى لتحديد وقوع طفرتين فى نفس الوحدة الوظيفية وبالتالى تكون طفرات أليلية أو أنهما

Embryo **الجنين**

كائن ما فى مراحل النمو الأولى.

Embryonic stem cell **خلايا الجذع الجنينية**

الخلايا الجذعيه المشتقه من مرحلة البلاستوسيت للجنين.

Endonuclease **إنزيم الإندونيوكلييز**

الإنزيم الذى يكسر الروابط الفوسفودايستر الداخلية فى الـــDNA المفرد الخيط أو المزدوج الخيط وكذلك خيط الـــRNA.

Enhancer **المعزز**

هو ذلك التتابع من القواعد فى جينوم الكائنات حقيقية النواة والفيروسات التى تهاجم الكائنات حقيقية النواة والذى يسبب زيادة فى معدل نسخ الجينات القريبة منه.

Enzyme **إنزيم**

هو البروتين أو مجموعة من البروتينات المتجمعة بترتيب معين والذى تحفز تفاعل بيوكيميائى ولا يحدث لها تحور أثناء عملية التحفيز.

Epigenic change **التغير الإبيجينيك**

يشير هذا الاصطلاح إلى التغيرات الوراثية والتى لا ترجع إلى تحورات فى التتابع النيوكليوتيدى للـــDNA وكذلك التغيرات فى تنظيم الجين ولكنه لا يورث بواسطة أى من نسل النبات.

Euchromatin **الايوكروماتين**

هو الكروماتين أو منطقة من الكروموسوم والتى لها خصائص صبغ طبيعية وتخضع لدورة التكثيف الطبيعي ونسبياً تكون غير ملتفة أو محلزنة فى نواة الدور البينى ومن الواضح أنها تحتوى على معظم الجينات.

Eukaryote **الكائنات حقيقية النواة**

هى الخلية أو الكائن الذى يتركب من الخلايا التى تحتوى على أنوية حقيقية تحتوى على الـــDNA والذى يحمل المعلومات الوراثية فى كل الخلايا وعديد من الفيروسات.

DNA ligase **إنزيم الـــ DNA ليجيز**

هو الإنزيم الذى يحفز تكوين روابط تعاونية بين الأطراف $3'$-OH و $5'$-P فى خيط الـــDNA عديدة النيوكليوتيدات المكسورة فى جزىء الـــDNA مزدوج الخيط.

DNA polymerase **إنزيم بلمرة الـــ DNA**

هو الإنزيم الذى يحفز تخليق الـــDNA فى الإتجاه $3' \longleftarrow 5'$ فى وجود خيط الـــDNA القالب.

DNA repair **اصلاح الـــDNA**

أى عملية من العمليات العديدة المتنوعة لإستعادة التتابع النيوكليوتيدى الصحيح للـــDNA والذى حدث به إدخال لنيوكليوتيدات غير صحيحة أو التى حدث لها تحور بأى طريقة ما.

DNA replication **تضاعف الـــDNA**

هى عملية نسخ جزىء الـــDNA.

E

EIA protein **البروتين EIA**

هو البروتين المبكر الذى ينتجه الأدينوفيرس والذى يعزز نسخ جينات الفيرس فى العدوى المبكرة والذى يرتبط ببروتين الخليه العائلة Rb.

Electrophoresis **الفصل الكهربائى**

هو التكنيك أو الطريقة المستخدمة لفصل الجزيئات على أساس الاختلاف فى معدل حركتها باستخدام مجال كهربائى خلال سائل أو جيل ما وتسمى غالباً هذه الحركة باسم الهجرة الكهربائية.

Elongation **الإطالة**

إضافة الأحماض الأمينية إلى السلسلة عديدة الببتيد النامية.

داخل غلاف نووى كما تحتوى الخلية على العضيات الخلوية السيتوبلازمية ويحدث فى هذه الخلايا الانقسام الميتوزى والميوزى.

Evolution **التطور**

تراكم التغيرات فى الخصائص الوراثية للأنواع مع مرور الزمن.

Excision **استئصال**

إزالة قطعة من الـDNA من كروموسوم ما مثل استئصال البروفاج من الكروموسوم البكتيرى.

Excisonase **إنزيم اكسيونيز**

الإنزيم الذى تتطلبه عملية استئصال البروفاج والذى يعمل مع إنزيم الإنتيجريز Integrase.

Exon **إكزون**

هو قطع من الـDNA لچين ما تنسخ وتترجم إلى سلسلة عديدة الببتيد وتنفصل هذه القطع عن بعضها بتتابعات من النيوكليوتيدات لا تترجم تسمى بالإنترونات وتوجد كل من الإكزونات والإنترونات أساساً فى چينات الكائنات حقيقية النواة.

Exonuclease **إنزيم اكسونيوكلييز**

هو الإنزيم الذى يزيل النيوكليوتيدات الطرفية من السلسلة عديدة النيوكليوتيدات بكسر الرابطة الفوسفودايستر الطرفية حيث يحدث إزالة للنيوكليوتيدات الطرفية بنجاح واحدة تلو الأخرى وغالباً ما يكون هذا الإنزيم خاص بالـDNA مفرد الخيط أو مزدوج الخيط وكذلك الـRNA مفرد الخيط .

F

Foster mother **الأم الحاضنة**

يستخدم هذا الاصطلاح فى مجال الوراثة ليشير لأنثى الحيوان التى تحمل الجنين المهندس وراثياً.

Founder animal **الحيوان المؤسس**

هو الحيوان الذى يعتبر العائل الأصلى للچين المنقول واستمراره بثبات.

F plasmid **البلازميد F**

هو بلازميد بكتيرى غالباً ما يسمى بالعامل F أو عامل الخصوبة أو بلازميد الجنس والقادر على الانتقال بنفسه من الخلية العائلة (F^+) إلى خلية أخرى لا تحتوى عليه (F^-) وعندما يندمج العامل F بالكروموسوم البكتيرى يصبح الكروموسوم البكتيرى قادر على الانتقال إلى الخلية F خلال عملية الاقتران البكتيرى.

Frameshift mutation

طفرة تغيير القالب الشفرى

هى الطفرة التى تحدث بسبب إما نقص أو إضافة زوج أو أكثر من النيوكليوتيدات فى چين ما ينتج عنه تغيير القالب الشفرى لكل الشفرات التى تلى موقع حدوث الطفرة فى الچين.

G

Gamete **جاميطة**

هى الخلية التناسلية الناضجة مثل الحيوان المنوى أو البويضة فى الحيوانات.

Gene **چين**

وحدة التوارث والذى يحتل موقع كروموسومى ثابت ويحتوى على المعلومات اللازمة لتكوين سلسلة عديدة الببتيد.

Gene amplification **تضخيم الچين**

هى الخلية التى بها بعض الچينات المعينة تخضع للتضاعف إما داخل الكروموسوم أو خارج الكروموسوم مسبباً ذلك زيادة عدد نسخ الچين.

Germinal mutation **الطفرات التناسلية**

هى الطفرات التى تحدث فى الخلية التى يشتق منها الجاميطات.

Germline **الخلايا التناسلية الأولية**

الخلايا التناسلية التى تنتج البويضات أو الحيوانات المنوية والتى لها دور فى تكوين الجيل التالى فى الكائنات حقيقية النواة.

Glyphosate **الجليفوسات**

مبيد حشائش يسبب قتل الحشائش عن طريق تثبيط تخليق الأحماض الأمينية الأروماتية فى النباتات.

H

H1, H2A, H2B, H3, H4

البروتينات الهستونية

هى الهستونات الخمسة الرئيسية فى الكروماتين.

Haploid **الحالة الاحادية العدد الكروموسومى**

الخلية أو الكائن الذى يحتوى على مجموعة واحدة من الكروموسومات.

Helper virus **الڤيرس المساعد**

هو الڤيرس الذى يقدم الوظائف الأساسية للڤيروسات الناقصة.

Helicase **إنزيم الهيليكيز**

الإنزيم الذى يشترك فى تضاعف الـــDNA عن طريق مساعدته فى فك خيطى الـــDNA بالقرب من شوكة التضاعف.

Hemizygous **الهيميزيجس**

هو الجين الذى يوجد فى صورة جرعة واحدة كما هو الحال فى حالة كروموسوم X فى الذكور الخليطة.

Histocompatability **تقبل النسيج**

هى تقبل النسيج المعاد زراعته فى الكائن المستقبل.

Gene expression **التعبير الجينى**

هى العملية متعددة الخطوات حيث يحدث تخليق ناتج الجين.

Gene library **مكتبة الجينات**

هى مجموعة كبيرة من حوامل الكلونة تحتوى على المجموعة الكاملة لقطع الـــDNA لجينوم كائن ما.

Gene product **ناتج الجين**

يستخدم هذا الاصطلاح للتعبير عن السلسلة عديدة الببتيد الناتجة من ترجمة الـــmRNA المنسوخ من على جين ما. واذا لم يحدث ترجمة الـــRNA (مثل الـــrRNA) يسمى جزىء الـــRNA الناتج باسم ناتج الجين.

Gene therapy **العلاج الجينى**

استحداث تحور فى جينوم كائن راقى بإضافة حامل كلونة يحتوى على جين معين لإزالة الضرر الوراثى أو الفشل الوراثى فى الإنسان.

Genetic code **الشفرة الوراثية**

هى مجموعة من الشفرات الوراثية الثلاثية والبالغ عددها ٦٤ شفرة تناظر الشفرات اللازمة للتعبير عن الأحماض الأمينية المختلفة وكذلك للتعبير عن شفرات بداية وانتهاء تخليق السلسلة عديدة الببتيد.

Genome **چينوم**

مجموعة الجينات الكاملة الموجودة بالخلية أو الڤيرس وغالباً ما يستخدم فى الكائنات حقيقية النواة للإشارة إلى كل الجينات الموجودة فى الخلية أحادية الكروموسومات (Haploid).

Genotype **التركيب الجينى**

هى البنية الوراثية لكائن ما أو ڤيرس والتى تميز الشكل المظهرى للكائن وغالباً ما يستخدم للإشارة للتركيب الأليلى لجين ما أو مجموعة من الجينات القليلة تحت الدراسة.

Hybrid **هجين**

هو الفرد الناتج من تزاوج أبوين غير متشابهين وراثياً أو هو جزىء الـــDNA مزدوج الخيط الناتج من مصدرين مختلفين.

Hydrogen bond **رابطة هيدروجينية**

هى رابطة غير تعاونية ضعيفة.

I

Immunity **المناعة**

هو اصطلاح عام يشير إلى مقاومة الكائن لمواد معينة ولكنه له عديد من المعانى الخاصة. ففى الحيوانات الراقية يشير إلى القدرة على الاستجابة للجزيئات الأجنبية عن طريق تخليق البروتينات التى تسمى الأجسام المضادة والتى تجعل الجزيئات الأجنبية غير فعالة ويشير كذلك فى الحيوانات إلى عدم قابليتها للإصابة أو العدوى بواسطة العوامل المسببة للمرض. وفى النظم البكتيرية يشير هذا الاصطلاح إلى مقاومة البكتيريا للتحلل بواسطة الفاج وكذلك المقاومة للبكتيريا التى تحتوى على البلازميد الذى يحتوى على جينات البروتينات السامة.

Immunoresponse **الاستجابة المناعية**

هى الظاهرة التى يتعرض فيها كائن ما إلى جزىء أجنبى ينتج عنها تخليق جسم مــضاد يُوجَّــه تجــاه الجزىء الأجنبى وإعادة تخليقه عندما يتعرض الكائن بعد ذلك لنفس الجزىء الأجنبى وكذلك يشير أيــضاً إلى المقاومة الكاملة أو الجزئية للعدوى التــى تلــى العدوى السابقة بنفس العائل المسبب للمرض.

Inducer **المُحفِّز**

هو الجزىء الذى يبدى تأثير تنظيمى بارتباطه بالبروتين المنظم.

Inducible enzyme **الإنزيم المُحفِّز**

هو الإنزيم الذى يحدث له تخليق فقط فى وجود مادة تفاعله أو بعض الجزيئات الكيميائية المعينة الشبيهة

Histone **الهستون**

أى بروتينات صغيرة قاعدية ترتبط بالـــDNA فى صورة كروماتين والهستونات الخمسة الأساسية هى H1, H2A, H2B, H3, H4

Histone acetyl transferanse (HAT)
إنزيم هستون أسيتايل ترانسفريز

هوالإنزيم الذى يضيف مجاميع الأسيتايل للهستونات.

Histone deacetylase (HAD)
إنزيم هستون دى أستيليز

هو الإنزيم الذى يزيل مجاميع الأسيتايل من الهستون.

HIV (Human immunodeficiency virus)
فيرس نقص المناعة فى الانسان

هو أحد أعضاء عائلة الروتروفيروسات والذى يسبب نقص المناعة فى الإنسان (الايدز AIDS).

Homologous **التماثل**

يستخدم للإشارة للـــDNA الذى يحمل نفس التتابع النيوكليوتيدى.

Homologous chromosomes
الكروموسومات المتماثلة

هى زوج الكروموسومات التى تقترن مع بعضها أثناء الإنقسام الميوزى والتى لها نفس التركيب وتحتوى على نفس المواقع الوراثية.

Homozygote **التركيب الجينى المتماثل**

هو الكائن الثنائى الكروموسومات أو متعدد الكروموسومات المتضاعفة الذى يحتوى على نفس الأليل عند موقع معين.

Hormone **هرمون**

جزىء صغير فى الكائنات حقيقية النواة والذى يحدث له تخليق فى أنسجة خاصة والذى ينظم نشاط خلايا أخرى خاصة وفى الحيوانات تنتقل الهرمونات من مصدرها إلى النسيج الهدف عن طريق مجرى الدم.

Interferons الانتروفيرونات

هى عائلة من البروتينات يحدث لها تحفيز فى الخلايا الحيوانية إستجابة للعدوى الفيرسية.

Intergenic complementation

التكامل بين الطفرات فى الچينات المختلفة

حدوث التكامل بين الطفرات فى چينات مختلفة.

Intragenic complementation

التكامل بين الطفرات فى نفس الچين

حدوث التكامل بين الطفرات فى نفس الچين.

Intron الإنترون

هو تلك المناطق من الچين التى تنسخ ولا تترجم إلى أحماض أمينية فى البروتين الناتج من نسخ وترجمة الچين والتى يحدث لها استئصال من المنسخ الأولى لتكوين جزىء الـــmRNA الناضج فى الكائنات حقيقية النواة.

Inverted repeat المكررة المعكوسة

هى تتابعات من القواعد فى الـــDNA والذى يكون إتجاهها فى جزىء معين من الـــDNA فى إتجاه معاكس لبعضها البعض وغالباً ما تتواجد فى نهايات العناصر المتنقلة من الـــDNA

In vitro experiment

التجربة فى أنبوبة اختبار

هى التجربة التى تجرى باستخدام المكونات المستخلصة من الخلايا.

In vivo experiment

التجربة فى الخلية الحية

هى التجربة التى تجرى باستخدام الخلايا الكاملة.

L

Lac I repressor البروتين الكابت I

هو البروتين الكابت الذى ينظم التعبير الچينى لچينات اوبرون اللاكتوز.

بمادة تفاعله والإنزيمات المحفزه عكس الإنزيمات التى تنتج بصوره مستمره.

Inducible promoter البروموتور التحفيزى

هو البروموتور الذى يكون فعالاً فقط تحت ظروف خاصة.

Initiation factors عوامل البداية

هى البروتينات التى تحتاجها عملية ابتداء تخليق البروتينات ويرمز لها بالرمز IF فى الكائنات غير حقيقية النواة وبالرمز eIF فى الكائنات حقيقية النواة متبوعاً برقم ما.

Insulator العازل

هو ذلك التتابع من الـــDNA الذى يحجب تأثير المعززات.

Insulin الانسولين

هرمون بروتينى صغير يصنع بواسطة البنكرياس والذى يتحكم فى مستوى السكر فى الدم.

Insulin receptor مستقبل الانسولين

بروتين على سطح الخلية والذى يعمل كمستقبل لهرمون الانسولين.

Integrase إنزيم الانتيجريز

هو الإنزيم الذى يحفز حدوث التبادل عند موقع خاص والذى يحدث عندما يدمج البروفاج فى الكروموسوم البكتيرى أو عندما يحدث استئصال للبروفاج من الكروموسوم البكتيرى ولكن فى عملية الاستئصال تحتاج أيضاً إلى بروتين اضافى هو إنزيم اكسيسونيز Excisionase.

Integration الإدماج

هى العملية التى بواسطتها يحدث ادماج كامل لجزىء الـــDNA فى جزىء DNA آخر قادر على التضاعف كما فى حالة ادماج البروفاج أو إدماج البلازميد أو الـــDNA الفيرسى فى كروموسوم ما.

Liposome **الليبوسوم**

أوعية مجوفة تحاط بغلاف من الفوسفولبيدات والتى قد تستخدم فى توصيل عديد النيوكليوتيدات أو العقاقير الطبية أو جزيئات أخرى عبر الغلاف الخلوى للخلايا المستقبلة.

Locus **الموقع**

هو موقع چين ما على كروموسوم ما.

Locus control region **موقع منطقة التحكم**

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى من الــDNA المنظم فى الكائنات حقيقية النواة والذى يتواجد فى مقدمة مجموعة الچينات المتجمعه التى يتحكم فيها.

Long terminal repeats (LTRs)
التتابعات الطرفية المتكررة الطويلة

هى مكررات من عديد من مئات من أزواج القواعد والتى تتواجد فى أطراف الرتروڤيروسات.

Lox P site **الموقع lox P**

هو تتابع خاص من النيوكليوتيدات والتى يتعرف عليها إنزيم الريكومبينيز Recombinase.

Luc gene **الچين luc**

هو الچين الذى يحمل شفرات إنزيم الليوسيفيريز فى الكائنات حقيقية النواة.

Luciferase **إنزيم الليوسيفيريز**

هو الإنزيم الذى يصدر ضوءاً عندما توجد مادة تفاعله الليوسيفرين.

Luciferin **الليوسيفيرين**

ماده كيميائية يستخدمها إنزيم الليوسيفريز ليصدر ضوءاً.

Lux gene **الچين lux**

هو الچين الذى يحمل شفرات إنزيم الليوسيفريز فى البكتيريا.

Lac operon **اوبرون اللاكتوز**

مجموعة الچينات التى يحتاجها ميتابولزم سكر اللاكتوز فى البكتيريا.

Lactose **اللاكتوز**

سكر ثنائى يتركب من سكر الجلوكوز والجالكتوز.

Lactose acetylase **إنزيم لاكتوز أسيتيليز**

هو البروتين الناتج من الچين lac A فى اوبرون اللاكتوز ووظيفته غير معروفه فى ميتابولزم سكر اللاكتوز.

Lactose permease **إنزيم الاكتوزبرمييز**

هو الإنزيم المسئول عن نقل سكر اللاكتوز من البيئة إلى داخل الخلية البكتيرية.

Lac z gene **الچين lac z**

هو أحد چينات اوبرون اللاكتوز التركيبية الذى ينسخ ويترجم الى إنزيم بيتاجلاكتوسيديز ويستخدم على نطاق واسع فى مجال الهندسة الوراثية كچين مخبر.

Lagging strand **الخيط المتلكىء**

هو خيط الــDNA المفرد والذى يحدث له تخليق فى صورة قطع من الــDNA والتى تتصل ببعضها فى النهاية.

Leading strand **الخيط المتقدم**

هو خيط الــDNA المفرد الذى يحدث له تخليق بصورة مستمرة.

Lethal mutation **الطفرة المميتة**

هى الطفرة التى ينتج عنها موت الفرد الحامل لها قبل أن يصل إلى مرحلة التكاثر.

Lipofection **الليبوفيكشن**

استخدام الليبوسوم فى نقل الــDNA او البروتينات إلى الخلية الهدف.

Mitochondrial death pathway
ممر الموت الميتوكونديرى
هو برنامج الموت الخلوى والذى يتضمن تنشيط بروتينات الميتوكوندريا لقتل الخلية وغالباً ما يحدث هذا التنشيط بواسطة عوامل داخلية مثل الضرر الذى يحدث للـــDNA.

Mono cistronic mRNA
الـــmRNA أحادى السسترون
هو جزىء الـــmRNA الذى يحمل المعلومات الوراثية لسسترون مفرد والذى يحمل بدوره الشفرات اللازمة لتكوين نوع واحد من البروتينات.

Mosaic **موزايك**
فرد ما يتركب من طرازين أو أكثر من الخلايا المختلفة وراثياً.

M phase (Mitosis phase) **المرحلة M**
هى المرحله الرابعة من دورة الخلية فى الكائنات حقيقية النواة والتى تنقسم فيها الخلية وتعرف أيضاً بالميتوزى.

Mutagen **المطفر**
عامل ما يكون قادر على زيادة معدل الطفور.

Mutagenesis **التطفر**
هى العملية التى يخضع فيها جين ما لحدوث تحور وراثى وأيضاً تسمى بالطفرة.

Mutant allele **الأليل الطافر**
هو الأليل الذى يختلف عن الأليل الطبيعى أو الأليل البرى وأيضاً هو الفرد الذى به أليل ما يظهر تعبيره على الشكل المظهرى.

Mutation **الطفرة**
هو التحور فى الجين والذى يورث وأيضاً هى العملية التى يكتسب من خلالها الجين التغير الوراثى.

Mutation rate **معدل الطفور**
احتمال حدوث طفرة جديدة عند موقع ما إما لكل جاميطة أو لكل جيل.

Lysis **التحلل**
تكسير الخلية البكتيرية بسبب تمزيق غلافهاالخلوى.

M

Metallothionine **الميتالوثيونين**
هو البروتين الذى يرتبط به العناصر الفلزية والذى يحفز تخليقه فقط عندما تتواجد عناصر ثقيلة معينة.

Metallothionine promoter
بروموتور ميتالوثيونين
هو بروموتور الجين الذى يحمل شفرات بروتين الميتالوثيونين ويستخدم فى الهندسة الوراثية لأنه بروموتور قوى جداً ويحفز عن طريق كميات ضئيلة من الزنك أو عناصر فلزية أخرى.

Metastasis **ميتاستاسس**
هى العملية التى تتحرك فيها الخلايا السرطانية من الورم الأولى إلى أجزاء الجسم وكذلك من السرطانات الثانوية.

Messenger RNA (mRNA)
الـــRNA الرسول
هو جزىء الـــRNA الناتج من نسخ خيط الـــDNA القالب وله القدرة على ترجمته إلى أحماض أمينية فى السلسلة عديدة الببتيد.

Methylation **إضافة مجموعة ميثايل**
هى تحوير قاعدة بالـــDNA أو الـــRNA بإضافة مجموعة ميثايل.

Minisatellite **المينى ساتيلايت**
هو اصطلاح آخر للمكررات المتتالية من الـــDNA ذات الاعداد المختلفة.

Missense mutation **الطفرة خاطئة المعنى**
هى الطفرة التى تحدث نتيجة لتغير شفرة واحدة وبالتالى يحدث إحلال لحامض أمينى محل آخر فى البروتين الناتج.

N

Neomycin phosphotransferase
إنزيم نيوميسين فوسفوترانسفيريز

هو الإنزيم الذى يشجع المقاومة للمضادات الحيوية مثل النيوميسين والكاناميسين.

N-formyl methionine (f met)
N-فورمايل ميثيونين

هو الحامض الأمينى الميثيونين المضاف إليه مجموعة الفورمايل والذى يستخدم كأول حامض أمينى فى السلسلة عديدة الببتيد عند تخليق البروتين فى البكتيريا.

Nonsense mutation **الطفرات عديمة المعنى**

هى الطفرة التى تغير شفرة خاصة بحامض أمينى إلى احدى الشفرات التى لا تعبر عن حامض أمينى (شفرات إنهاء الترجمة) وينتج عن ذلك تكوين سلاسل عديدة الببتيد غير كاملة.

Nuclease **إنزيم النيوكلييز**

هو الإنزيم الذى يكسر الرابطة الفوسفودايستر فى الـــDNA أو الـــRNA.

Nuclear microinjection
الحقن النووى الدقيق

هو الطريقة المستخدمة فى ادخال الـــDNA الأجنبى فى نواة الخلية العائلة.

Nuclear pores **ثقوب الغلاف النووى**

هى الثقوب فى الغلاف النووى التى تسمح للبروتينات والـــRNA والجزيئات الأخرى من الدخول أو الخروج من النواة.

Nucleoid **النيوكلويد**

وتوجد بالسيتوبلازم فى الخلايا غير حقيقية النواة والبلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا وغالباً يشير إلى وحدة الـــDNA الرئيسية فى البكتيريا.

Nucleoside **نيوكليوسيد**

هى ارتباط القاعدة البيورينية أو البيريميدنية بروابط تعاونية بسكرالريبوز أوالديزوكسى ريبوز .

Nucleosome **نيوكليوسوم**

هى الوحدة الأساسية المتكررة للكروماتين وتتركب من جزىء يتركب من جزيئين كل منهما أحد بروتينات الهستون الأربعة المختلفة تحيط بطول من الـــDNA يحتوى على ١٤٥ زوج من النيوكليوتيدات الملتفة وتتصل بجزىء مركزى آخر مجاور يحتوى على ٥٥ زوج من النيوكليوتيدات من الـــDNA الرابط والمرتبط بالطراز الخامس من بروتين الهستون.

Nucleotide **نيوكليوتيد**

ارتباط الفوسفات بالنيوكليوسيد.

O

Okazaki fragment **قطعة اوكازاكى**

هى أحد قطع الـــDNA القصيرة الناتجة أثناء التضاعف المتقطع لخيط الـــDNA المتلكىء.

Oncogene **الجين المُسَرْطِنْ**

هو ذلك الجين الذى يُنَشِطْ ابتداء تكوين الورم.

Oncogenic virus **الڤيرس المُسَرْطِن**

هو الڤيرس الذى يسبب السرطان.

Oocyte **خلية البويضة**

خلية البويضة الأولية.

Operator **اوبريتور**

هو المنطقة المنظمة فى الـــDNA التى تتفاعل مع بروتين كابت خاص وذلك للتحكم فى نسخ الجينات التركيبية المجاورة.

Operon **أوبرون**

مجموعة الجينات التى يتم تنظيم تعبيرها بواسطة كل من اوبريتور ما وجين كابت ما.

Origin **منشأ**

هو منشأ التضاعف وهو عبارة عن تتابع من قواعد الـــDNA والتى يحدث عندها ابتداء تضاعف الـــDNA.

P

P21 protein **البروتينP21**

هو البروتين الذى يغلق الانقسام الخلوى بارتباطه بالسَيكلينات وتثبيطها.

P53 gene **الجينP53**

هو جين المضاد للسرطان والذى يطفر غالباً فى الخلايا السرطانية.

P site (peptidyl site)

الموقع P من الريبوسوم

الموقع من الريبوسوم الذى يحدث فيه تكوين الرابطة الببتيدية.

Palindrome **بالندروم**

هو تتابع معين يحتوى ما بين ٤ إلى ٨ نيوكليوتيدات بترتيب معين يوجد بالـــDNA تتعرف عليه إنزيمات القطع المحدد حيث تقوم هذه الإنزيمات بكسر الرابطة فوسفودايستر عند هذه التتابعات بصورة متناظرة فى كلا خيطى الـــDNA تنتج عنها أطراف $3'$-OH و $5'$-P تعرف بالأطراف العمياء أو تحدث كسور عند مناطق غير متناظرة داخل البالندروم فى كلا خيطى الـــDNA مكونة أطرف $3'$-OH و $5'$-P تعرف بالأطراف الملحمة.

P elements **العناصر P**

هى الترنسبوزونات التى وجدت فى الدروسوفيلا والحشرات الأخرى.

Peptide bond **رابطة ببتيدية**

هو رابطة تعاونية بين مجموعة الأمينو فى حامض أمينى ما ومجموعة الكربوكسيل فى حامض أمينى آخر.

Peptidyl transferase

إنزيم ببتيديل ترانسفيريز

هو النشاط الإنزيمى للريبوسومات المسئولة عن تكوين الرابطة الببتيدية حيث يتكون الموقع النشط من هذا الإنزيم من عديد من البروتينات الريبوسومية.

Phage **الفاج**

هو الفيرس الذى يهاج البكتيريا ويسمى أيضاً بالبكتريوفاج.

Phenotype **الشكل المظهرى**

هو الخصائص المُشَاهَدة لخليةٍ ما أو لكائنٍ ما أو الناتجة من تفاعل التركيب الجينى مع البيئة.

Phosphodiester bond

الرابطة فوسفودايستر

فى الأحماض النووية فإن الرابطة التعاونية بين مجموعة الفوسفات ومجموعة $3'$-OH فى النيوكليوسيد والتى يحث لها امتداد بين الكربون $3'$ فى السكر وكربون $5'$ فى السكر المجاور. وهذه الروابط تكون العمود الفقرى للأحماض النووية.

Plaque **بلاكى**

مساحة رائقة خالية من البكتيريا النامية على بيئة صلبة والناشئة من تحلل الخلايا البكتيرية الناتجة من مهاجمة الفيرس للخلايا البكتيرية وتحتوى هذه المساحة الرائقة على جزيئات فيرسية فقط وأحياناً يستخدم هذا الاصطلاح فى الفيروسات الحيوانية التى تسبب هذه المساحات الرائقة فى طبقات الخلايا الحيوانية النامية على بيئة للزراعة.

Plasmid **بلازميد**

هو عباره عن مادة وراثية (DNA) غير كروموسومية والتى لها القدرة على التضاعف بصورة مستقلة عن كروموسوم الخلية العائلة وقد يتواجد فى صورة نسخة واحدة أو عديد من النسخ لكل خلية وأنه يحدث له انعزال إلى الخلايا الشقيقة

Polymerase **إنزيم البوليميز**

هو الإنزيم الذى يحفز تكوين روابط تعاونية بين النيوكليوتيدات مثل إنزيم بلمرة الــDNA او بلمرة الــRNA.

Polymerization start site

موقع بداية البلمرة

هى النيوكليوتيدة فى البروموتور المكملة لأول نيوكليوتيدة فى خيط الــmRNA الذى يحدث له تخليق أو نسخ.

Polynucleotide chain

السلسلة عديدة النيوكليوتيدات

هو جزىء مفرد الخيط يتركب من نيوكليوتيدات ترتبط ببعضها تعاونياً واحدة تلو الأخرى.

Polypeptide **السلسلة عديدة الببتيد**

هو جزىء متعدد الوحدات البنائية من الأحماض الأمينية المرتبطة ببعضها عن طريق الروابط الببتيدية.

Polyploidy **التضاعف الكروموسومى**

هو الخلية أو الكائن الذى يحتوى على أكثر من مجموعتين كاملتين من الكروموسومات.

Polyribosome (polysome)

عديد الريبوسوم

هو مركب يحتوى على ريبوسوم أو أكثر المرتبطة بجزىء mRNA ما والتى تشترك بنشاط فى تخليق السلسلة عديدة الببتيد.

Polysome **بولى سوم**

مجموعة من الريبوسومات المرتبطة بنفس الــmRNA وترجمته.

Positive regulation **التنظيم الموجب**

تنظيم التعبير الجينى بواسطة منشط ما والذى يعزز التعبير الجينى عندما يرتبط به.

أثناء الانقسام الخلوى بطريقة منظمة أو بطريقة عشوائية وبعض البلازميدات مثل العائل F قد تندمج بكروموسوم الخلية العائلة.

Point mutation **الطفرة الموضعية**

هى الطفرة الناشئة عن احلال أو نقص أو اضافة زوج من النيوكلتيوتيدات.

Poly (A) tail

الذيل عديد نيوكليوتيدات الأدينين

هو الحدوث الطبيعى لإضافة عديد من نيوكليوتيدات الأدينين للطرف $3'$ من الــmRNA فى الكائنات حقيقية النواة حيث تحدث هذه الاضافة إلى الطرف $3'$ من المنسخ الأولى.

Polycistrenic mRNA

الحامض النووى الرسول متعدد السسترونات

هو جزىء الــmRNA والذى يحدث له ترجمة إلى اثنين أو أكثر من أنواع السلاسل الببتيدية والذى يتواجد بصورة أساسية فى الكائنات غير حقيقية النواة.

Poly (d A tail)

الذيل متعدد نيوكليوتيدات الديزوكسى أدينين

هو تتابعات من الديزوكسى أدينين والتى يحدث إضافة لها معملياً إلى أحد أو كلا طرفى $3'$ من خيطى الــDNA مزدوج الخيط ويستخدم فى الهندسة الوراثية لربط جزيئين من الــDNA فى الطريقة المعروفة باسم طريقة وصل الذيل المتجانس.

Polymer **بوليمر**

هو تنظيم وترتيب الروابط التعاونية لوحدات أساسية لتكوين مركب كبيرمثل السلاسل عديدة النيوكليوتيدات أو السلاسل عديدة الببتيد.

Prokaryote **الكائن غير حقيقى النوة**

هو أى كائن ينقصه الغلاف النووى والذى فيه لا تنقسم النواة انقساماً ميتوزياً أو ميوزياً مثل البكتيريا والطحالب الزرقاء المخضرة.

Promoter **البروموتور**

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى من الـــDNA الخاص والذى يرتبط به إنزيمات بلمرة الـــRNA لإبتداء النسخ.

Promoter recognition

التعرف على البروموتور

هو أول خطوة فى نسخ الجين.

Pronuclei **برونيوكلاى**

هى الأنوية المذكرة والمؤنثة الموجودة فى البويضات المخصبة قبل حدوث الاندماج بينهما.

Prophage **البروفاج**

هو صورة من الفاج (الڤيرس) والذى يحدث فيه إدماج للـــDNA الڤيرسى بالكروموسوم البكتيرى للخلية العائلة.

Protease **إنزيم البروتييز**

هو الإنزيم الذى يكسر الروابط الببتيدية فى السلسلة عديدة الببتيد.

Protein **البروتين**

هو الجزىء الذى يتركب من سلسلة أو أكثر من السلاسل عديدة الببتيد.

Proteome **بروتيوم**

هو المجموعة الكلية من البروتينات التى توجد شفراتها فى جينوم ما أو هو المجموعة الكلية المتكاملة من البروتينات لكائن ما.

Proto-oncogene **بروتواونكوچين**

هو الأليل الأصلى ذو الطراز البرى للچين المسرطن أو هو الأليل الأصلى غير الطافرمن الأليل البرى.

Preproinsulin **بريبروانسولين**

هو جزىء الانسولين المخلق فى صورته الأوليه.

Primary transcript

المنسخ الأولى

نسخه ما من الـــRNA الناتجة من نسخ چين ما وعادة يشير هذا الاصطلاح إلى الجزىء الذى يجب أن يحور ليصبح على صورة جزىء mRNA قابل للترجمة.

Primase **إنزيم البريمييز**

هو الإنزيم المسئول عن تخليق الـــRNA البادىء لإبتداء تخليق الـــDNA.

Primer **البادىء**

فى الأحماض النووية فإن هذا البادىء هو عبارة عن قطعة صغيرة مفردة الخيط من الـــRNA أو الـــDNA والتى تكون فعالة كنقطة نمو فى عملية البلمرة.

Processing

عملية تكوين جزيئات الـــRNA الناضجة

هو مجموعة من التفاعلات الكيميائية والتى فيها يحدث تحويل المنسخ الأولى من الـــRNA إلى الـــmRNA ناضج أو جزيئات من الـــtRNA و rRNA ناضجة.

Prodrug **العقار الأولى**

هو العقار غير الضار والذى يتحول إلى عقار فعال وظيفياً بواسطة إنزيم خاص.

Proinsulin **البروانسولين**

هو بادىء الانسولين والذى يحتوى على كل من السلسله A و B بالاضافة للسلسلة عديدة الببتيد التى تصلهما ببعض.

Recessive allele **الأليل المتنحى**

هو أليل ما يظهر تأثيره فقط عندما يوجد بصورة متماثلة أو هو الشكل المظهرى الذى يظهر عندما يوجد أليل بصورة متماثلة.

Recombinant cell or individual

الخلية أو المفرد المعاد توليفه وراثياً

هو الخلية أو الفرد الجديد الذى ينشأ نتيجة لحدوث إعادة التوليف للمادة الوراثية.

Recombinant DNA

الـــDNA المعاد توليفه

هو عبارة عن جزىء من الـــDNA يتركب من قطع من الـــDNA مشتقة من جزيئات من الـــDNA من مصادر مختلفة.

Recombinant human somototropin

هرمون السوماتوتروبين الإنسانى المعاد توليفه

هرمون النمو الإنسانى المنتج بواسطة كائن آخر.

Recombinant plasmids

البلازميدات المعاد توليفها

هى البلازميدات التى تحتوى على قطع من الـــDNA والذى لا تتواجد أصلاً فى البلازميد وغالباً ما تكون من كائن آخر.

Regulator gene **الجين المنظم**

هو الجين الذى وظيفته الأساسية تنظيم معدل تخليق ناتج جين آخر أو أكثر من جين آخر.

Release factor **عامل التحرر**

هو البروتين الذى يتعرف على شفرة توقف الترجمة ويقوم بتحرير السلسلة عديدة الببتيد من على الريبوسوم.

Replacement gene therapy

العلاج الجينى بالإحلال

علاج الفشل الوراثى بإدخال نسخ فعالة وظيفياً من الجين الذى به الفشل الوراثى.

Pseudogene **الجين الكاذب**

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى من الـــDNA والمشابهه بدرجة كبيرة لتلك التتابعات من الـــDNA التى تنتج بروتينات فعالة وظيفياً. وهذا الجين الكاذب يرجع اما لحدوث طفرات فى التتابع الشفرى أو الى عدم المقدرة على نسخه وترجمته وبالتالى لا ينتج بروتين فعال وظيفياً ولقد شوهدت الجينات الكاذبة فى جينات الكائنات حقيقية النواة فقط وغالباً ما توجد هذه الجينات فى منطقة كبيرة من الـــDNA والتى تحتوى على عديد من التتابعات المتطابقة تقريباً أو المكررة مكونة عائلة جينية ويعتقد أنها طرز طافرة من تتابع نيوكليوتيدى أصلى.

Purines **بيورين**

هو قسم من القواعد العضوية الموجودة بالأحماض النووية ومن البيورينات الشائعة الأدينين والجوانين.

Pyrimidine **بيريميدين**

هو قسم من القواعد العضوية الموجودة بالأحماض النووية ومنها الثيمين والسيتوسين واليوراسيل.

Pyrimidine dimmer **البريميدين دايمر**

قاعدتين من البريميدين المتجاورتين مثل الثيمين المتجاورتين فى نفس خيط عديد النيوكليوتيدات حيث يتكون بينهما روابط كيميائية والذى غالباً ما يحدث عند تعرض الـــDNA للأشعة فوق البنفسجية.

Protoplast **بروتوبلاست**

هى الخلايا النباتية المنفصله عن بعضها والتى أزيلت جدرها الخلوية.

R

rBST (Recombinant bovine somatotropin)

سوماتروبين بوفين المعاد توليفه

بوفين هرمون النمو المنتج بواسطة كائن آخر.

Ribonuclease **إنزيم الريبونيوكليز**

هو الإنزيم الذى يكسر الرابطة فوسفودايستر فى الـــRNA ويرمز بالرمز RNase.

Ribosomal RNA (rRNA)

الحامض النووى الريبوسومى

هو جزيئات الـــRNA الريبوسومية (rRNA) والتى تمثل المكون التركيبى لوحدات الريبوسومات وفى الكائنات حقيقية النواة يوجد أربعة طرز من rRNA وهى28S, 18S, 5.8S, 5S بينما فى الكائنات غير حقيقية النواة يوجد ثلاثة طرز من الـــrRNA وهى 23S, 16S, 5S.

Ribosome **ريبوسوم**

هو عضو خلوى يتركب من وحدتين كل وحدة منهما تتركب من البروتين و الـــRNA والتى يحدث بواسطتها ترجمة الـــmRNA إلى أحماض أمينية أثناء تخليق البروتين وفى الكائنات غير حقيقية النواة تكون الوحدتين التى يتركب منها الريبوسوم هى 30S , 50S بينما فى الكائنات حقيقية النواة تكون الوحدتين هما 60S , 40S.

Ribosome binding site

موقع الارتباط بالريبوسوم

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى فى طرف الـــmRNA فى الكائنات غير حقيقية النواة والذى يرتبط به الريبوسوم ليبدأ تخليق البروتين ويسمى أيضاً باسم تتابع Shine-Dalgarno.

RNA **الحامض النووى الريبوزى**

حامض الريبونيوكليك والذى يحتوى على السكر الخماسى الريبوز و الـــRNA النموذجى عبارة عن خيط مفرد يحتوى على القواعد النيتروجينية الأربعة وهى الأدينين والجوانين والسيتوسين واليوراسيل.

RNA polymerase **إنزيم بلمرة الـــRNA**

هو الإنزيم الذى يقوم بنسخ الـــRNA من على الخيط المفرد من الـــDNA.

Replication fork **شوكة التضاعف**

فى جزىء الـــDNA الذى يحدث له تضاعف تعتبرشوكة التضاعف هى المنطقة التى يحدث عندها إضافة النيوكليوتيدات لخيوط الـــDNA النامية.

Replication origin **منشأ التضاعف**

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى فى الـــDNA الذى يبدأ عنده بداية تخليق الـــDNA الجديد.

Replicon **ريبليكون**

هو عبارة عن جزىء الـــDNA الذى يحتوى على منشأ التضاعف.

Repressor **الكابت**

هو البروتين الكابت الذى يمنع نسخ چين ما.

Repressor protein **البروتين الكابت**

هو ذلك البروتين الذى يرتبط بالاوبريتور المجاور لچين ما ويقفل نسخ هذا الچين.

Restriction endonuclease

إنزيم الاندونيوكليز المحدد

هو الإنزيم الذى يتعرف على تتابع معين من النيوكليوتيدات فى الـــDNA ويكسر الـــDNA عند هذا التتابع.

Restriction enzyme **إنزيم القطع المحدد**

هو طراز من إنزيمات الاندونيوكليز والتى تقطع الـــDNA مزدوج الخيط عند تتابع معين من القواعد والذى يعرف بموقع التعرف أو البالندروم.

Retrovirus **رتروفيرس**

أحد أقسام الڤيروسات الحيوانية التى مادتها الوراثية هى الـــRNA والتى تسبب تخليق الـــDNA مكمل لچينومها من الـــRNA عند مهاجمتها للخلايا العائلة.

Reverse transcriptase **إنزيم النسخ العكسى**

هو الإنزيم الذى يوجد فى الغلاف البروتينى للرتروڤيروسات والذى يقوم بتخليق الـــDNA المكمل لخيط الـــRNA القالب.

متتابعات من النيوكليوتيدات القصيرة والمتكررة عديد من المرات فى الجينوم أو فى DNA الميتوكوندريا أو DNA البلاستيدات الخضراء.

SCID (Severe combined immunodeficiency) نقص المناعة القاسية

نقص المناعة الذى يرجع إلى فقد كل من الخلايا البائية (B cells) والخلايا التائية (T cells) ويرجع ٢٥% من حالات نقص المناعة القاسية (SCID) إلى نقص إنزيم أدينوزين دى أمينيز (Adenosine deaminase).

Semiconservative replication
التضاعف نصف المحافظ

هو النظام الطبيعى لتضاعف الـــDNA والذى فيه يعمل كل خيط من خيطى الـــDNA كقالب لتخليق خيط جديد مكمل من الـــDNA وعلى ذلك يكون كل جزىء من جزئيات من الـــDNA الشقيقة تتركب من خيط قديم (أبوى) وخيط آخر جديد.

Sense strand الخيط المعنى

هو خيط الـــDNA الذى يعمل كقالب لنسخ جين ما.

Shine-Dalgarno sequence
تتابع شين دلجارنو

هو ذلك التتابع من الـــDNA الذى يرتبط به الريبوسوم.

Sigma (δ) subunit الوحدة سجما

هو الوحدة من إنزيم بلمرة الـــRNA التى تتعرف على البروموتور.

Silencer السيلنسر

من المصطلحات الوراثية التى تشير إلى غلق تعبير الجين وهو تتابعات من النيوكليوتيدات بالـــDNA يرتبط بها بروتينات معينه لغلق التعبير الجينى.

Silent mutation الطفرة الساكنة

أى طفرة لا يكون لها تأثير على الشكل المظهرى.

RNA polymeraseI إنزيم بلمرة الـــ RNA

هو إنزيم البلمرة فى الكائنات حقيقية النواة الذى يقوم بنسخ جينات الأحماض النووية الريبوسومية (rRNAs).

RNA polymerase II إنزيم البلمرة II

هو إنزيم البلمرة فى الكائنات حقيقية النواة الذى بنسخ الجينات التى تحمل شفرات البروتينات.

RNA polymerase III إنزيم البلمرة III

هو إنزيم البلمرة فى الكائنات حقيقية النواة الذى بنسخ جينات الـــ5srRNA و tRNA.

RNA processing
عملية تحويل المنسخ الأولى إلى الـــRNA

هى عملية تحويل المنسخ الأولى إلى mRNA و rRNA أو إلى tRNA وتشمل عملية الوصل والكسور وتحوير النهايات وفى حالة الـــtRNA تتضمن تحوير القواعد الداخلية.

RNA splicing وصل الـــRNA

إزالة الإنترونات وتجميع الإكزونات من المنسخ الأولى.

Rous sarcoma virus فيرس روس سركوما

أحد طرز الرتروفيروسات التى دُرِسَت بإستفاضة ويهاجم الدجاج.

S

Sarcoma سركوما

هو سرطان ينشأ فى خلايا العضلات.

Satellite DNA ساتلايت الـــDNA

هو عبارة عن الـــDNA فى الكائنات حقيقية النواة. والذى يكون حزمة صغيرة (Minor) عند كثافات مختلفة عن غالبية الـــDNA الخلوى باستخدام الطرد المركزى فى محلول متزن متدرج التركيز ويتركب

80 S ribosome **الوحدة الريبوسومية 80 S**

الشكل النشط لريبوسومات الكائنات حقيقية النواة ووحدة 40S ويتركب من وحدة ريبوسومية 60Sريبوسومية.

60 S ribosomal subunit
الوحده الريبوسوميه 60 S

هى الوحدة الريبوسزمبه الكبيرة التى تدخل فى تركيب الريبوسوم الكامل فى الكائنات حقيقية النواة.

40 S ribosomal subunit
الوحدة الريبوسومية 40 S

هى الوحدة الريبوسومية الصغيرة فى ريبوسوم الكائنات غير حقيقية النواة.

70 S ribosome **الوحدة الريبوسومية70 S**

فى الكائنات غير حقيقية النواة فإن الجزىء النشط فى تخليق البروتين يتركب من وحدتين هما 30S و50S واللتان يتركب منهما الريبوسوم الكامل70S.

50 S ribosomal subunit
الوحدة الريبوسومية 50 S

هى الوحدة الريبوسومية الكبيرة فى ريبوسوم الكائنات حقيقية النواة.

30 S ribosomal subunit
الوحدة الريبوسومية 30 S

هى الوحدة الريبوسومية الصغيرة التى تدخل فى تركيب الريبوسوم فى الكائنات غير حقيقية النواة.

Start codon **شفرة البداية**

هى شفره فى الـــmRNA ذات التتابع AUG حيث يحدث عندها ابتداء تخليق السلسلة عديدة الببتيد.

Stem cell **الخلية الجذعية**

هى الخلية البادئة التى تعطى خلايا خاصة ذات طرز مختلفة وكذلك مزيد من الخلايا الجذعية.

Somatic cell **الخلية الجسمية**

أى خلية فى الكائنات متعددة الخلايا ماعدا الجاميطات والخلايا التناسلية التى تتكون منها الجاميطات.

Somatotropin **سوماتوتروبين**

هو هرمون يتركب من سلسلة عديدة الببتيد والذى يتحكم فى نمو الخلية والتكاثر فى الإنسان والحيوانات الأخرى.

Spacer sequence
التتابعات النيوكليوتيدية الفاصلة

هى التتابعات النيوكليوتيدية غير الشفرية الموجودة بين التتابعات النيوكليوتيدية الشفرية فى جزىء الـــDNA والموجودة بين الجينات.

Species **النوع**

من الناحية الوراثية هو مجموعة من الكائنات التى تمتلك القدرة على التزاوج فيما بينها.

Specific transcription factors
عوامل النسخ الخاصة

هى بروتينات منظمة والتى تبدى تأثيرها على چين مفرد أو اوبرون أو على عدد قليل من الچينات ذات الصلة.

Splicing factors **عوامل الوصل**

هى الجزيئات التى تزيل الإنترونات ووصل الإكزونات من المنسخ الأولى من الـــRNA (hnRNA).

Spontaneous mutation **الطفرة التلقائية**

هى الطفرة التى تحدث فى غياب أى مادة مطفرة معروفة.

Src oncogene **الچين المسرطنsrc**

هو الچين المسرطن الذى يحمله ڤيرس Rous sarcoma والمشتق أصلاً من خلايا الدجاج

Steroid **استرويد**

طراز من جزىء البولسيسيليك ليبوفيليك والذى يحتوى على الكولسترول وهو هرمون الجنس.

Steroid hormones **هرمونات الاسترويد**

هى هرمونات الاسترويد مثل هرمونات الجنس.

Steroid receptor **مستقبل الاسترويد**

هو بروتين مزدوج الوظيفة والذى يعمل كمستقبل لهرمون الاسترويد وكعامل نسخ.

Stop codon **شفرة التوقف**

هى واحدة من الشفرات الثلاثة UAG أو UAA أو UGA فى جزىء الـــmRNA والتى يتوقف عندها تخليق السلسلة عديدة الببتيد.

Structural gene **الجين التركيبى**

هو الجين الذى يحمل تتابع شفرات الأحماض الأمينية لسلسلة عديدة الببتيد ما.

T

TATA box **الصندوق TATA**

هو تتابع القواعد فى بروموتور الكائنات حقيقية النواة والذى يرتبط به إنزيم بلمرة الـــRNA وأحياناً يسمى باسم Hogness box ويشير الحرف T و A لكل من قاعدة الثيمين والأدينين على التوالى.

T cells **الخلايا التائية**

هى خلايا النظام المناعى التى تزيل الخلايا المعدية بالفيرس وتفرز عوامل ذائبة تنشط خلايا أخرى فى النظام المناعى وخاصة الخلايا البائية (B cells) ومسئوله عن صناعة مستقبلات الخلايا التائية أكثر منه صناعة الأجسام المضادة.

Telomerase **إنزيم التلوميريز**

الإنزيم الذى يصنع الـــRNA بالاضافه للبروتين والذى يعيد إطالة التلوميرات بإضافة الـــDNA إلى طرف كروموسوم ما فى الكائنات حقيقية النواة.

Telomere **التلومير**

هو الكروموميرات الطرفية لكروموسوم ما وهو عبارة عن تتابع من الـــDNA الذى يتطلبه ثبات أطراف الكروموسوم.

Template **القالب**

هو خيط الـــDNA والذى يستخدم كقالب لتخليق خيط جديد عن طريق الاقتران بين أزواج القواعد المكملة.

Template strand **الخيط المطبوع**

هو خيط الحامض النووى الذى ينسخ من تفاعل البلمرة.

Terminal nucleotidyl transferase

إنزيم النيوكليوتيديل ترانسفيريز الطرفى

هو الإنزيم الذى يضيف النيوكليوتيدات إلى الطرف 3′ لأحد خيطى الـــDNA مزدوج الخيط والمستخدم فى الهندسة الوراثية لتكوين أطراف متماثلة فى خيطى الـــDNA.

Tet O operator **اوبريتور التت (Tet O)**

هو موقع فى مقدمة اوبرون التت (tet operon) حيث يرتبط به البروتين الكابت.

Tet operon **اوبرون التت (Tet)**

مجموعة الجينات البكتيرية المتجمعة والتى تشجع المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين.

Tetracyclines **التتراسيكلينات**

عائلة من المضادات الحيوية ذات أربعة حلقات مندمجة مشتقة من الممر بولى كيتيد (Polyketide).

Tet R repressor **الكابت Tet R**

هو البروتين الكابت الذى ينظم عمل أوبرون التت (Tet operon).

Therapeutic cloning **الكلونة العلاجية**

هى الكلونة للحصول على نسيج لإعادة زراعته بعكس توليد فرد جديد.

Transformation **التحول**

هو تحول التركيب الجينى للبكتيريا بتعرضها للـDNA المعزول من بكتيريا أخرى ذات تركيب جينى مختلف.

Transgene **الجين المنقول**

هو الجين الأجنبى الذى يحدث له إدماج فى كائن ما باستخدام الهندسة الوراثية.

Transgenic **الترانسجينيك**

هو كائن ما به قطعة أجنبية من الـDNA حدث له إدماج ثابت بجينومه.

Transgenic plant **النبات المعدل وراثياً**

هو النبات الذى يحتوى على الجين المنقول من نبات آخر مختلف أو من كائن آخر.

Translation **الترجمة**

صناعة أو تخليق البروتين باستخدام المعلومات المقدمة بواسطة الـmRNA.

Translatome **الترانسلاتوم**

مجموعة البروتينات الكلية التى ترجمت بالفعل والتى تتواجد بخلية ما تحت مجموعة معينة من الظروف.

Transposable element **العامل المتنقل**

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى من الـDNA القادر على الحركة والتنقل من موقع إلى آخر داخل الجينوم.

Transposase **إنزيم الترانسبوساز**

هو الإنزيم المسئول عن حركة وتنقل الترانسبوززون.

Trehalase **إنزيم التريهالاز**

هو الإنزيم الذى يكسر سكر التريهالوز إلى جزئين من سكر الجلوكوز.

Thyroid hormone **هرمون الثيرويد**

هو الهرمون الذى يصنع بواسطة الغدة الدرقية.

Toxin **توكسين**

جزىء سام وغالباً ما يكون بروتين ذو منشأ بيولوجى وخصوصاً يشير هذا المصطلح إلى البروتينات التى تصنعها البكتيريا المُمْرِضة.

Trans configuration **الشكل التنافرى**

هو ترتيب الجينات المرتبطة والذى يكون فيه الفرد الخليط فى موقعين طفريين حيث حصل على أحد الموقعين الطفريين من أحد الأبويين والموقع الطفرى الآخر من الأب الآخر مثل $a^1+/+a^2$.

Transcription **النسخ**

هى العملية التى تنسخ فيها المعلومات الموجودة فى الخيط القالب من الـDNA فى صورة خيط مفرد من الـRNA حيث يكون ترتيب القواعد مكمل لتلك الموجودة فى خيط الـDNA القالب.

Transcription bubble **انبعاج النسخ**

هى المنطقة من الـDNA والتى يحدث عندها فتح الحلزون المزدوج من الـDNA بصوره مؤقتة بما يسمح بحدوث النسخ.

Transcription factor **عامل النسخ**

هو البروتين الذى ينظم التعبير الجينى عن طريق ارتباطه بالـDNA عند منطقة التحكم من الجين.

Transcription start site **موقع بداية النسخ**

هى نقطة البداية والتى يبدأ عندها تحويل جين ما إلى نسخة من الـRNA.

Transcriptome **ترانسكريبتوم**

المجمع الكلى من الـRNA المنسوخة الموجودة بخلية ما تحت مجموعة خاصة من الظروف.

Unique-sequence DNA

التتابعات النيوكليتيدية الفريدة

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى الذى يحدث فقط بصورة مفردة فى الچينوم الأحادى بالمقارنة بالتتابعات النيوكليوتيدية المتكررة.

Universal genetic code

عمومية الشفرة الوراثية

ثبات وعمومية الشفرة الوراثية للأحماض الأمينية المختلفة فى كل الكائنات.

V

Vector **الحامل**

فى الهندسة الوراثية هو عبارة عن جزىء من الـDNA القادر على التضاعف ويستخدم كحامل لجزىء الـDNA أو قطعة من الـDNA ويسمى بحامل الكلونة ومن هذه الحاملات البلازميدات البكتيرية وجزيئات الـDNA الڤيرسية.

Virion **ڤيريون**

جزىء الڤيرس فى الحالة الحرة وقبل تطفله على الخلية العائلة.

W

Wobble **الترنح**

هو الاقتران البديل لعديد من القواعد بقاعدة معينة فى الموقع الثالث من الشفرة فى عملية الاقتران بين الشفرة والشفرة المضادة.

Wild type **الطراز البرى**

هو الشكل المظهرى أو التركيب الچينى الشائع فى العشيره الطبيعية.

Terhalose **سكر التريهالوز**

هو سكر مخزن غير مختزل فى النبات والذى يحمى النبات ضد فقد الماء.

Trehalase-6-phosphate phosphatase

إنزيم تريهالاز-٦-فوسفات فوسفاتيز

هو الإنزيم الذى يزيل الفوسفات من التريهالوز-٦-فوسفات.

Triplet codon **الشفرة الثلاثية**

هى الشفره التى تتركب من تابع معين من ثلاثة قواعد تعبر عن حاض أمينى معين.

tRNA **الحامض النووى الناقل**

هو جزىء صغير من الـRNA الذى يقوم بترجمة الشفرات فى الـmRNA إلى أحماض أمينية أثناء تخليق البروتين ويحتوى على تتابع من ثلاثة قواعد تعرف بالشفرة المضادة والمكملة بشفرة خاصة فى جزىء الـmRNA عند الموقع الذى يحدث عنده ارتباط حامض أمينى معين او من اى مصدر اخر.

Tumor-suppressor gene

الچين الكابت للورم

هو الچين الذى يعمل على منع الانقسام الخلوى غير المرغوب ويسمى أيضاً بالچين المسرطن المضاد (Anti-oncogene).

U

Uncharged tRNA

الحامض النووى الناقل غير المحمل

هو جزىء الـtRNA الذى لا يحمل أى حامض أمينى.